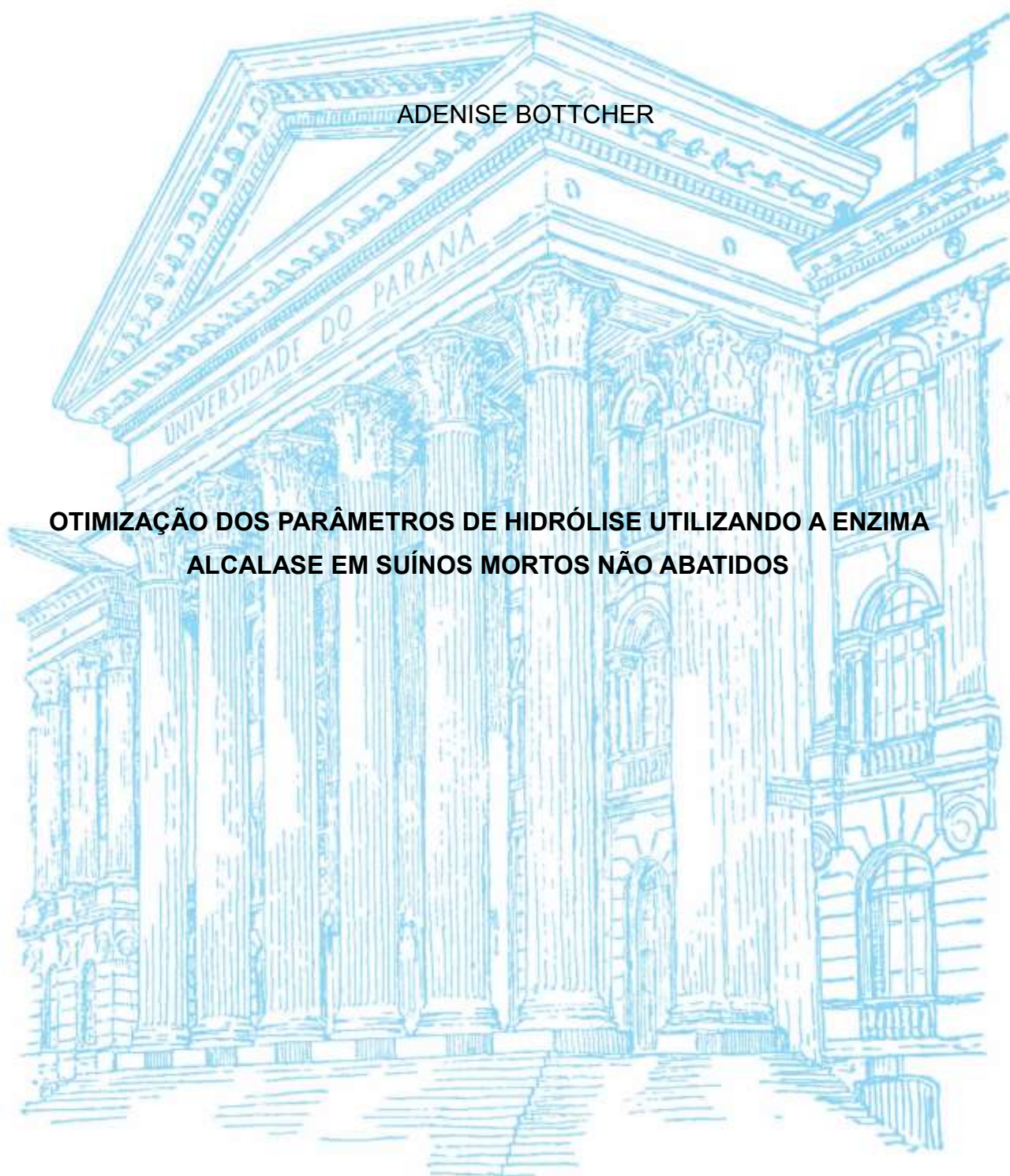


UFPR - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADENISE BOTTCHER

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE HIDRÓLISE UTILIZANDO A ENZIMA  
ALCALASE EM SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS**



PALOTINA

2018

ADENISE BOTTCHER

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE HIDRÓLISE UTILIZANDO A ENZIMA  
ALCALASE EM SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologias de Bioprodutos Agroindustriais, no Programa de Pós-Graduação do Setor Palotina, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Jonathan Dieter  
Coorientador: Dr. Everton Luis Krabbe  
Coorientador: Joel Gustavo Teleken

PALOTINA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Bottcher, Adenise

B751 Otimização dos parâmetros de hidrólise utilizando a enzima  
alcalase em suínos mortos não abatidos / Adenise Bottcher .  
-- Palotina, 2018  
82f.

Orientador: Jonathan Dieter

Coorientador: Everton Luis Krabbe

Coorientador: Joel Gustavo Teleken

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Tecnologias de  
Bioprodutos Agroindustriais.

1. Suinocultura . 2. Hidrolisado enzimático . 3. Matéria  
Hidrolisada I. Dieter, Jonathan. II. Krabbe, Everton Luis . III.  
Teleken, Joel Gustavo. IV. Universidade Federal do Paraná.  
IV. Título.

CDU 636.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO TECNOLOGIAS DE  
BIOPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

## TERMO DE APROVAÇÃO

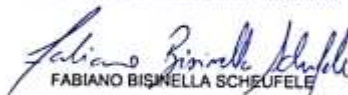
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TECNOLOGIAS DE BIOPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ADENISE BOTTCHE** intitulada: **OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE HIDRÓLISE UTILIZANDO A ENZIMA ALCALASE EM SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 26 de Fevereiro de 2018.

  
JONATHAN DIETER

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
FABIANO BISINELLA SCHEUELE

Avaliador Externo (UFPR)

  
RAQUEL STROHER

Avaliador Externo (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que iluminou meu caminho, guiou meus passos, e me concedeu força e saúde durante essa caminhada para que pudesse chegar até aqui.

À minha mãe uma pessoa maravilhosa que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, e não mediu esforços para que esse sonho se realizasse. Ao meu pai (*in memoriam*), por todo seu ensinamento, educação e pelos valores que me ensinou. Saudades eternas!

A todos os meus familiares que sempre me incentivaram e me apoiaram.

Ao meu esposo Alexandre Claus por todo carinho, compreensão e paciência, com certeza foi à pessoa que esteve ao meu lado em todos os momentos me ajudando e me incentivando.

Ao professor Dr. Jonathan Dieter pela oportunidade e por toda ajuda e dedicação na elaboração deste trabalho, obrigada por todo seu ensinamento.

Ao pesquisador Dr. Everton Krabbe pela oportunidade de estar realizando este projeto na Embrapa Suínos e Aves. Obrigada por toda a aprendizagem, e por não medir esforços para repassar todo seu conhecimento.

Aos analistas da Embrapa Suínos e Aves Dra Gizelle Bedendo e Dr. Diego Surek que foram essenciais neste projeto, muito obrigada por toda ajuda e dedicação em me auxiliar durante todas as etapas deste trabalho.

As amigas que Deus colocou em minha vida e escolhi para conviver, Poliana Pasinato Rigo e Larissa Corezzolla, pessoas maravilhosas que também foram muito importantes e me ajudaram muito neste projeto.

A todos os docentes e funcionários da UFPR.

Aos membros da banca avaliadora Dra Raquel Ströher e Dr. Fabiano Bisinella Scheufele, desde já por terem aceitado participar e contribuir neste momento.

Muito obrigada!

“No que diz respeito ao empenho,  
ao compromisso, ao esforço, à dedicação,  
não existe meio termo. Ou você faz uma  
coisa bem feita ou não faz”

“Há um grande desejo em mim de  
sempre melhorar. Melhorar.  
É o que me faz feliz”.

(Ayrton Senna)

## RESUMO

O emprego de processos biotecnológicos, como a hidrólise enzimática, vem se apresentando como uma eficiente técnica para obtenção de diversos produtos. O objetivo deste trabalho foi otimizar a temperatura, o pH e a adição ou não de enzima protease, no processo de hidrólise em suínos mortos não abatidos triturados. Para o estudo foram realizados dois experimentos em planejamento composto central rotacional (DCCR) sem e com adição de enzima, com pontos axiais, totalizando 12 e 18 ensaios, respectivamente. No experimento sem enzima foi testado as temperaturas: 49,4 °C, 52,5 °C, 60,0 °C, 67,5 °C e 70,6 °C e os ajustes de pH iniciais foram: 6,09, 6,50, 7,50, 8,50 e 8,91. Já no experimento com enzima, as temperaturas utilizadas foram: 47,4 °C, 52,5 °C, 60,0 °C, 67,5 °C e 72,6 °C; associados as concentrações de enzima aplicadas: 0,50, 1,30, 2,50, 3,70 e 4,50 kg/ton; e os ajustes de pH inicial foram: 5,82, 6,50, 7,50, 8,50 e 9,18. Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Suínos e Aves localizada no município de Concórdia – SC. O material utilizado na hidrólise foi proveniente de dois suínos mortos e não eviscerados, triturados e homogenizados, com peso médio de 25 kg e 63 dias de idade. O acompanhamento da hidrólise foi realizado com coletas nos tempos de 1, 2, 6, 12, 24 e 48h. As respostas avaliadas foram porcentagem de matéria hidrolisada, nitrogênio recuperado, grau de hidrólise no hidrolisado, matéria seca e cinzas do resíduo final não hidrolisado e proteína bruta final do hidrolisado líquido. Para o planejamento estatístico do estudo utilizou-se (DCCR), e os dados experimentais foram avaliados utilizando análise de regressão múltipla. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para validar o modelo pelo teste do ajuste. No experimento sem adição de enzimas, as temperaturas que se destacaram foram entre 52,5 °C e 60,0 °C, porém, temperaturas próximas a 52,5 °C ocasionaram um início de processo de putrefação após 12h. No experimento em que se utilizou enzima as concentrações mais relevantes foram entre 2,50 kg/ton e 3,70 kg/ton, e temperaturas entre 60,0 °C e 67,5 °C. A análise estatística dos resultados dos dois experimentos demonstraram que os diferentes ajustes de pH iniciais não apresentaram efeito para os ensaios. Os resultados dos ensaios do experimento com enzimas, apresentaram-se satisfatórios para a maioria dos parâmetros, nas 6h iniciais de hidrólise. Conforme os resultados obtidos, a enzima Alcalase foi mais eficiente do que a condição da não utilização de enzimas, para a degradação de suínos mortos triturados, obtendo-se respostas relevantes em relação as variáveis avaliadas, principalmente para porcentagem de matéria hidrolisada, parâmetro importante para este estudo.

**Palavras-chave:** Protease. Hidrolisado enzimático. Matéria hidrolisada. Nitrogênio recuperado. Grau de hidrólise. Suinocultura. Destinação da mortalidade.

## ABSTRACT

The use of biotechnological processes, such as enzymatic hydrolysis, stands out as an efficient technique to obtain several products. The objective of this work was to optimize the temperature, pH and the addition or not of protease enzyme, in the hydrolysis process in non-slaughtered crushed dead pigs. For the study, two experiments were carried out in planning the central composite rotatable desing (DCCR) without and with addition of enzyme, with axial points, totaling 12 and 18 assays, respectively. In the experiment without enzyme the temperatures were tested: 49.4 °C, 52.5 °C, 60.0 °C, 67.5 °C and 70.6 °C and the initial pH adjustments were: 6.09, 6.50, 7.50, 8.50 and 8.91. In the enzyme experiment, the temperatures used were: 47.4 °C, 52.5 °C, 60.0 °C, 67.5 °C and 72.6 °C; associated with the enzyme concentrations applied: 0.50, 1.30, 2.50, 3.70 and 4.50 kg/ton; and the initial pH adjustments were: 5.82, 6.50, 7.50, 8.50 and 9.18. The experiments were conducted at Embrapa Swine and Poultry located in the city of Concórdia - SC. The used material in the hydrolysis came from two pigs that had not been eviscerated, crushed and homogenized, with a mean weight of 25 kg and 63 days of age. Hydrolysis monitoring was performed with sampling at times of 1, 2, 6, 12, 24 and 48h. The evaluated responses were percentage of hydrolyzed matter, nitrogen recovered, degree of hydrolysis in the hydrolyzate, dry matter and ashes of the final nonhydrolyzed residue and final crude protein of the liquid hydrolyzate. Statistical planning of the study was used (DCCR), and the experimental data were evaluated using multiple regression analysis. The analysis of variance (ANOVA) was applied to validate the model by the fit test. In the experiment without addition of enzymes, the temperatures that stood out were between 52.5 °C and 60.0 °C, but temperatures close to 52.5 °C caused a process of putrefaction to begin after 12h. The most relevant enzyme concentrations were between 2.50 kg/ton and 3.70 kg/ton, and temperatures between 60.0 °C and 67.5 °C. Statistical analysis of the results of the two experiments showed that the different initial pH adjustments had no effect for the assays. The results of the experiments of the enzyme experiment were satisfactory for the majority of the parameters in the initial 6h of hydrolysis. According to the results, the Alcalase enzyme was more efficient than the non-enzyme condition for the degradation of crushed dead pigs, obtaining relevant responses in relation to the evaluated variables, mainly for the percentage of hydrolyzed matter, an important parameter for this study.

**Key words:** Protease, Enzymatic hydrolyzate, Hydrolyzed matter, Nitrogen recovered, Degree of hydrolysis, Swine culture, Mortality destination.



## LISTA DE SIGLAS

DDCR	-	Delineamento Composto Central Rotacional
EMBRAPA	-	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Abastecimento
IAL	-	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUB	-	União Internacional de Bioquímica
MSR	-	Metodologia de Superfície de Resposta
RPM	-	Rotação por Minuto
TCA	-	Ácido tricloroacético
TEC-DAM	-	Tecnologias de destinação de Animais Mortos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1	SUINOCULTURA .....	15
2.1.1	Suinocultura brasileira .....	15
2.1.2	Destinação de animais mortos não abatidos .....	16
2.2	ENZIMAS.....	17
2.2.1	Origem das enzimas.....	17
2.2.2	Proteases .....	18
2.3	HIDRÓLISE .....	19
2.3.1	Hidrólise enzimática.....	19
2.3.2	Hidrolisado proteico .....	20
2.3.3	Fatores que influenciam a hidrólise .....	21
2.4	AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE .....	24
2.4.1	Porcentagem de matéria hidrolisada .....	24
2.4.2	Recuperação de nitrogênio.....	24
2.4.3	Grau de hidrólise .....	25
2.4.4	Matéria seca e cinzas do resíduo .....	25
2.4.5	Proteína bruta final .....	25
2.4.6	Metodologia de superfície de resposta .....	26
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	28
3.2	LOCALIZAÇÃO.....	30
3.3	MATERIAL .....	30
3.4	ENZIMA .....	31
3.5	HIDRÓLISE .....	31
3.6	VARIÁVEIS AVALIADAS NO PROCESSO .....	32
3.6.1	Matéria hidrolisada .....	32
3.6.2	Nitrogênio recuperado no hidrolisado .....	32
3.6.3	Grau de hidrólise no hidrolisado .....	33
3.6.4	Matéria seca do resíduo não hidrolisado .....	33
3.6.5	Cinzas do resíduo não hidrolisado.....	34
3.6.6	Análise estatística.....	34

<b>4</b>	<b>ANÁLISE DE RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
4.1	MATÉRIA HIDROLISADA .....	36
4.2	NITROGÊNIO RECUPERADO.....	40
4.3	GRAU DE HIDRÓLISE .....	41
4.4	MATÉRIA SECA, CINZAS E PROTEÍNA BRUTA FINAL .....	44
<b>5</b>	<b>ANÁLISE DE RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
5.1	MATÉRIA HIDROLISADA .....	46
5.2	NITROGÊNIO RECUPERADO.....	54
5.3	GRAU DE HIDRÓLISE .....	56
5.4	MATÉRIA SECA, CINZAS E PROTEÍNA BRUTA FINAL .....	60
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVA DE USO DO HIDROLISADO .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>
	<b>APÊNDICE 1 – SUPERFICIE DE RESPOSTA PARA MATÉRIA HIDROLISADA – INTERAÇÃO PH X TEMPERATURA .....</b>	<b>74</b>
	<b>APÊNDICE 2 – SUPERFICIE DE RESPOSTA PARA MATÉRIA HIDROLISADA - INTERAÇÃO PH X ENZIMA.....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO 1 - FICHA TÉCNICA DA ENZIMA ALCALASE.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma das atividades econômicas que vem se destacando no ramo de proteína animal. A demanda pelo consumo de carne suína estimula a atividade no país, que tem alcançado resultados positivos decorrentes do aperfeiçoamento tecnológico nas áreas de genética, alavancado pela biotecnologia, aprimoramento na nutrição, manejo e sanidade durante o período de criação dos animais. O Brasil possui indústrias eficientes e competitivas no ramo da suinocultura no cenário mundial.

De acordo com os dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), nos três primeiros trimestres de 2017 o número de cabeças de suínos abatidos no Brasil foi de 32,11 milhões, totalizando 2.837,9 toneladas de carcaças. O aumento da produção de carne suína é justificado pelo crescimento nas exportações e pelo consumo interno deste tipo de proteína, que geralmente possui um menor custo em relação a carne bovina.

Um problema enfrentado pelos produtores de suínos é a destinação dos animais que morrem nos plantéis durante o ciclo de produção. Dúvidas de como e para onde destinar esses animais tem gerado preocupação, tendo em vista que o Brasil possui legislação restrita para a destinação, por meio da técnica de compostagem. O problema desta prática antiga, é o fato de não ser compatível com a atual escala de produção, assim acaba não atendendo a mortalidade catastrófica que pode ocorrer nos plantéis, além deste procedimento apresentar riscos sanitários. Muitas vezes o descarte acontece de forma totalmente incorreta por parte dos produtores, sendo esses animais lançados em locais impróprios, podendo afetar a qualidade de vida da população, da fauna e flora, acarretando danos irreversíveis para o meio ambiente.

Uma técnica que vem se tornando relevante é o uso de enzimas proteolíticas em processos industriais com diferentes possibilidades de aplicação. O uso de enzima pode desempenhar papéis dentro das indústrias em diversas atividades no ramo produtivo, assim como também podem ser aplicadas como uma forma de degradação do material para um possível descarte do resíduo obtido de diversos processos produtivos. Atualmente encontram-se disponíveis diversas enzimas comerciais para a hidrólise de proteínas, sendo a Alcalase uma das mais utilizadas para produção de hidrolisados proteicos. Essa enzima é obtida por meio da fermentação submersa do

*Bacillus licheniformis* (SLYZYTE et al., 2005). Fatores como temperatura, pH, concentração de enzima, características do substrato e tempo de reação devem ser cuidadosamente estudados, para que a reação ocorra da forma eficiente conforme a ficha técnica da enzima Alcalase.

Diante dos problemas que os animais que morrem durante o ciclo de produção geram o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade técnica da utilização da enzima Alcalase em suínos mortos não abatidos triturados visando a degradação desses tecidos. Dessa forma utilizou-se como base matéria hidrolisada, nitrogênio recuperado, grau de hidrólise, matéria seca e cinzas do resíduo final não hidrolisado e proteína bruta no hidrolisado final através da interação de diferentes temperaturas, concentração de enzima e ajustes de pH inicial, por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) visando o desenvolvimento de uma nova rota de destinação com possibilidade de agregação de valor para as cadeias de produção animal.

Com o propósito de contribuir com a suinocultura brasileira, por meio da construção de uma nova alternativa para a destinação de carcaças de animais mortos, o objetivo desta dissertação foi estudar a degradação de tecido animal na ausência e na adição de enzima exógena, definindo a melhor associação de temperatura, pH e concentração de enzima para a degradação do substrato visando a máxima cinética de conversão de carcaça suína triturada em hidrolisado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SUINOCULTURA

#### 2.1.1 Suinocultura brasileira

O Brasil tem se apresentado no decorrer dos anos um grande produtor de alimentos. O aumento no consumo de carnes bem como o crescimento na exportação tem revelado uma expansão considerável na economia do país. Esses números são impulsionados também pela produção de carne suína, que aumentou consideravelmente nos últimos anos (KRABBE et al., 2013).

A carne suína ocupa a terceira posição em produção e consumo no Brasil, se destaca significativamente no setor da agropecuária, e isso se deve ao aumento na produção proporcionado pelo sistema integrado de criação e pelo melhoramento genético. A proteína suína conquistou espaço na mesa dos brasileiros, além de ser muito utilizada para a produção de diversos produtos nas agroindústrias, como salames, hambúrguer, presunto, mortadela entre outros (MAPA, 2014).

De acordo com os dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, nos três primeiros trimestres de 2017 o número de cabeças de suínos abatidos no Brasil foi de 32,11 milhões, totalizando 2.837,9 toneladas de carcaças. O aumento da produção de carne suína é justificado pelo crescimento nas exportações e pelo consumo deste tipo de proteína, que geralmente possui um menor custo em relação a carne bovina (IBGE, 2018).

A suinocultura é uma atividade de grande relevância para a economia brasileira, entretando com o crescimento desta prática ocorre também um aumento nos impactos ambientais quando esses animais são destinados de forma incorreta, como a contaminação de solos e rios, a presença de odor e de vetores como ratos, moscas e baratas (CHERUBINI et al., 2015).

A produção de suínos em larga escala está associada a impactos de grande proporção ao meio ambiente, pois envolve várias etapas, como por exemplo, a criação dos animais, o transporte, reprodução, a engorda e a destinação desses animais que morrem durante o ciclo de produção (LAMNATOU et al., 2016).

### 2.1.2 Destinação de animais mortos não abatidos

No Brasil atualmente existe legislação para a destinação de animais que morrem durante o ciclo de produção por meio da técnica de compostagem, que muitas vezes não supri a demanda, principalmente no ramo de suínos. Além disso, não se conhece quais técnicas são utilizadas pelos produtores rurais para a destinação e nem quais são os riscos de contaminação que podem acarretar. Devido aos problemas que os animais mortos podem gerar se não destinados de forma adequada, diversas esferas do setor de produção recorrem ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em busca de uma regulamentação para o descarte desses animais (WILBERT et al., 2016).

As mortalidades rotineiras nos rebanhos no Brasil geram mais de 1 milhão de toneladas por ano de animais mortos, correspondendo a 26% na região sul, 25% no Centro-oeste, 19% Sudoeste, 16% no Nordeste e 15% no Norte. Sendo constatado que os valores são representados por 58% de bovinos de corte, 18% por aves, 15% de bovinos de leite e 9% de suínos. Os maiores números de animais mortos estão concentrados na região Sul, com 557 kg/km<sup>2</sup> (EMBRAPA, 2016).

Com o objetivo de desenvolver soluções para a problemática do destino desses animais mortos durante o ciclo de produção tanto de aves como suínos, a Embrapa desenvolveu o projeto “Tecnologias para destinação de animais mortos (TEC-DAM)” (WILBERT et al., 2016).

Para a realização deste projeto os animais mortos são manuseados de forma a minimizar os riscos que podem acarretar ao meio ambiente, a saúde e segurança do trabalhador. A compostagem por longo período de tempo foi a única forma de destinação desses animais, mas com o aumento na produção essa técnica se tornou insuficiente para suprir o volume gerado. Nos dias de hoje novas técnicas estão disponibilizadas para esse processo, por exemplo, a incineração e reciclagem das carcaças para elaboração de farinhas, a biodigestão anaeróbia, e a hidrólise enzimática (EMBRAPA, 2016).

## 2.2 ENZIMAS

### 2.2.1 Origem das enzimas

A ciência que estuda as enzimas é designada de enzimologia, esse termo foi apresentado pela primeira vez em 1878 por Willian Kühne para denominar microrganismos utilizados em fermentações. As enzimas são classificadas como catalisadores biológicos, e na antiguidade já eram usadas na fabricação de pães e vinhos. Eduard Buchner no ano de 1897 observou que os extratos de levedura eram capazes de fermentar o açúcar transformando-o em álcool e constatou também que as enzimas realizavam a fermentação e seguiam agindo mesmo após serem retiradas do meio em que estavam. Essa descoberta rendeu a Eduard o prêmio Nobel de Química no ano de 1907, de acordo com Michael e Menten (1913) citado por (MONTEIRO; SILVA, 2009).

As enzimas são classificadas como proteínas de alta complexidade molecular, que quando encontram condições adequadas de temperatura, pH e umidade, agem nos substratos, atuando como catalisadores em todas as reações biológicas (BRAGA et al., 2012). São obtidas por técnicas biotecnológicas, e são amplamente utilizadas em indústrias de diversos seguimentos (MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES 2007). São consideradas ferramentas-chave dentro dos estudos biotecnológicos e em diversas áreas por sua natureza catalítica e sua capacidade de realizar reações hidrolítica (FRAATZ; RÜHL e ZORN, 2014; JEMLI et al., 2016).

São produzidas por técnicas de isolamento de materiais de origem animal ou vegetal ou até mesmo por meio de fermentação realizada por bactérias ou fungos (BRAGA et al., 2012). As enzimas de origem microbiana são as mais utilizadas devido à variedade e simplicidade na manipulação dos microrganismos, curto tempo para o processo, uso de substratos com baixo custo como os resíduos agrícolas, e o alto desempenho na produção devido ao aprimoramento das condições das técnicas fermentativas por tecnologias de DNA recombinante ou por mutações (SAID; PIETRO, 2002).

Para a obtenção de microrganismos que produzam enzimas por meio de processos industriais pode-se utilizar alguns métodos, como por exemplo a obtenção de mutantes naturais, de mutantes induzidos por formas convencionais,



microrganismos recombinantes, recursos de engenharia genética e por isolamento baseado em recursos naturais (VAZ; PRADO; CARVALHO, 2008).

Pesquisas e estudos de novas enzimas são indispensáveis para o avanço na área, como também o melhoramento das já exploradas e utilizadas. Além disso o aprofundamento na investigação de diferentes linhagens de microorganismos produtores dessas enzimas de grande importância e deve ser contínuo (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Com o aumento na demanda por hidrolisados obtidos através de proteína animal com características interessantes, o desenvolvimento de pesquisas e estudos voltados para constatar a enzima ideal e a otimização das condições de reação para cada tipo de substrato são de grande importância (QI et al., 2009).

As enzimas possuem a capacidade de realizar catálise de reações biológicas aumentando a velocidade de uma reação. Em geral os processos realizados através do uso de enzimas são relativamente mais rápidos e mais eficientes quando comparado a hidrólise por ácidos ou álcalis. O desenvolvimento de novos procedimentos industriais que utilizem enzimas e o aprimoramento das já utilizadas estão em constante evolução (MONTEIRO; SILVA, 2009).

### 2.2.1 PROTEASES

São denominadas enzimas proteolíticas ou proteases as enzimas utilizadas em processos de hidrólises que clivam ligações peptídicas em proteínas e em seus fragmentos (CLEMENTE, 2000). Possuem a capacidade de catalisar a clivagem das ligações peptídicas das proteínas, chamadas de hidrolases, utilizando uma molécula de água durante a reação (BRAGA et al., 2012).

No ano de 1956, a União Internacional de Bioquímica (IUB) elaborou uma Comissão Internacional de Enzimas, devido a evolução nos estudos e descobertas das mesmas. Essa comissão procurou sistematizar classes e nomes das enzimas (MONTEIRO; SILVA, 2009).

São classificadas de acordo com sua especificidade, as exopeptidases atuam nas extremidades da cadeia peptídica, e as endopeptidases possuem a capacidade de clivar ligações dentro da cadeia polipeptídica (HSU, 2010).

As proteases são catalogadas conforme seu mecanismo catalítico: cisteína protease, serina protease, metaloprotease e aspártico protease (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008).

A enzima Alcalase é obtida por meio de fermentação submersa do *Bacillus licheniformis*. É considerada uma das enzimas de maior uso e destaque nos processos de hidrólises (SLYZYTE et al., 2005). Tem sido amplamente utilizada principalmente em indústrias alimentícias em produtos para pessoas alérgicas, em bebidas com alta concentração de proteína entre outros (QI et al., 2009).

Para a resolução do problema de descarte dos resíduos dentro das indústrias o processo de hidrólise utilizando enzimas proteolíticas se apresenta como uma alternativa interessante na obtenção de produtos com elevados valores nutricionais e comerciais como por exemplo em indústrias processadoras de peixe (SLIZYTE, et al., 2005).

## 2.3 HIDRÓLISE

### 2.3.1 Hidrólise enzimática

O processo de hidrólise pode ser realizado por meio de enzimas, ácidos ou álcalis, pode-se também fazer a combinação de duas técnicas ao mesmo tempo, porém a realização de hidrólise por meio do uso de enzimas é considerada mais interessante, principalmente quando se visa a utilização do hidrolisado em indústrias de alimentos (FONKWE; SINGH, 1996; GONÇALVES 2011).

Reações enzimáticas apresentam vantagens em relação a processos que são utilizados catalisadores químicos, pelo fato de apresentarem menor formação de sais, menor formação de subproduto, geralmente o solvente utilizado é a água e a velocidade de reação é maior (MUSSATTO, FERNANDES; MILAGRES 2007). Além de apresentar custos reduzidos, o uso de enzimas é uma técnica menos poluente, e possibilita a obtenção de rendimentos bem próximos a de estequiométricos (DE AGUIAR, 2010). Originam uma fração solúvel que possui uma grande quantidade de proteínas hidrolisadas (DUAN et al., 2010).

A hidrólise enzimática vem sendo muito utilizada para modificar as propriedades nutricionais e funcionais de proteínas alimentares. Esse procedimento

pode ser aplicado quando se deseja o aumento e a incorporação de proteínas em elaborações específicas (SPELLMAN et al., 2003).

O uso de enzimas proteolíticas promove a quebra das ligações peptídicas dos aminoácidos da proteína presente no material, e possibilita a produção de hidrolisados com diversas estruturas moleculares e com características funcionais que podem ser aplicadas em produtos alimentícios (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

Se a hidrólise for realizada em condições controladas, é possível garantir boas características nutricionais, sendo permitido utilizar o valor de grau de hidrólise como um critério de comparação de qualidade do hidrolisado proteico, principalmente quando o hidrolisado é utilizado pela indústria alimentícia (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

De acordo com Gonçalves (2011), o método de hidrólise por meio do uso de enzimas em proteína é considerado relativamente simples. A primeira etapa é submeter o material a uma moagem, com a finalidade de se adquirir uma amostra fragmentada, após deve-se acrescentar água na proporção ideal para cada experimento, ajusta-se o pH quando necessário e planejado e na última etapa adiciona-se a enzima. A escolha da enzima é de grande importância de acordo com o material utilizado, que pode vir a interferir no produto final da hidrólise (GAUTHIER; POULIOT, 2003).

Pesquisas relacionadas a processos enzimáticos vem crescendo bastante nos últimos anos, experimentos e estudos são realizados com o objetivo de conhecer novas técnicas para otimização dos experimentos através de enzimas (PATEL, 2014).

### 2.3.2 Hidrolisado proteico

Na hidrólise enzimática ocorre a adição de enzimas exógenas, sendo um procedimento que possibilita a obtenção de um hidrolisado com as características desejadas e conforme sua finalidade, sendo importante o controle de alguns parâmetros durante a reação, como por exemplo a escolha da enzima específica para cada tipo de substrato a ser manipulado, temperatura, pH, concentração de enzima e tempo de reação (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009).

Os hidrolisados obtidos por meio de proteínas ou utilizando-se material proteico possuem diferentes aplicações nas indústrias, podendo ser adicionado em produtos de nutrição animal, na alimentação humana em produtos farmacêuticos e

em cosméticos. Além disso os hidrolisados podem também ser utilizados como fontes de nitrogênio em culturas microbianas (SAFARI et al., 2011). São aplicados em sistemas de nutrição especialmente em produtos destinados a pessoas que não conseguem digerir a proteína pura, como no caso de indivíduos alérgicos a determinadas proteínas (BHASKAR et al., 2007).

Os hidrolisados apresentam potencial para serem utilizados em diversas aplicações por sua excelente solubilidade em água em uma ampla faixa de pH, podendo ser aplicados em bebidas esportivas com elevado valor proteico, em alimentos dietéticos e na produção de alimentos hipoalergênicos para bebês. Podem ser aplicados também como fonte de cálcio, potássio, fósforo, e magnésio na nutrição humana (FONKWE E SING, 1996).

O hidrolisado é largamente utilizado para obtenção de peptídeos de proteína (KRISTINSSON E RASCO, 2000). E esses peptídeos apresentam diversas atividades biológicas por exemplo como anticoagulante, antioxidante, antiobesidade, antidiabéticas e antihipertensivo (ELAVARASAN; NAVEEN e SHAMASUNDAR, 2014).

### 2.3.3 Fatores que influenciam a hidrólise

As enzimas são vantajosas quando utilizadas em processos industriais, apesar disso apresentam uma certa vulnerabilidade diante de variações do pH e temperatura.

Para a obtenção de hidrolisados com características interessantes alguns parâmetros devem ser antecipadamente estudados e controlados, como a temperatura, pH, concentração de enzima, especificidade e propriedade de enzima e relação enzima/substrato. A otimização desses parâmetros juntamente com o conhecimento dos mesmos é de grande importância sendo essencial para o desenvolvimento de um processo economicamente viável (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009).

A funcionalidade das enzimas depende de determinadas condições, como por exemplo o tamanho, estrutura, e composição dos aminoácidos, assim como também aspectos como temperatura, pH, e a presença de íons no meio (ELAVARASAN; NAVEEN e SHAMASUNDAR, 2014).

Os fatores que influenciam na hidrólise são o pH, temperatura, concentração de enzima, o tipo de substrato e o tempo de reação. O efeito desses fatores pode se diferenciar dependendo da enzima utilizada, fato este que se evidencia a importância do estudo desses parâmetros (VIANA, 2004).

De acordo com Adler-Nissen (1986), as variáveis de maior relevância dentro do processo enzimático são a temperatura, o pH, a especificidade e concentração da enzima e o substrato utilizado. Para se obter um procedimento de qualidade e economicamente viável é necessário antecipadamente ter o conhecimento desses fatores, tendo em vista que a otimização dessas variáveis é muito importante para a eficiência da hidrólise.

Os conhecimentos dos fatores relacionados devem ser estudados anteriormente, as condições ótimas de reações enzimáticas são avaliadas e desenvolvidas por modelos baseados na estatística. Esses tipos de modelo possuem grande importância para as análises de sistemas complexos. A metodologia de resposta (RSM), tem sido muito utilizada nesses tipos de processos (QI et al; 2009). É uma metodologia muito utilizada em diferentes substratos em procedimentos de hidrólise enzimática (ESLAHI; DADASHIAN e NEJAD, 2013; SEO et al., 2015).

A temperatura certamente é um dos parâmetros de maior relevância, tendo em vista que cada enzima apresenta uma temperatura ideal para o seu desempenho, constatando que o tempo de duração do processo também deve ser observado. Desta forma os valores de temperatura e a resistência entre as enzimas pode variar, devido a estabilidade e ao fator de resistência ao calor que está relacionado com a duração da reação enzimática (REED, 1975).

A temperatura afeta a atividade da enzima pois eleva a energia cinética das moléculas resultando em um aumento na possibilidade de choques entre o substrato e a enzima. As elevadas temperaturas levam as enzimas a passarem por mudanças conformacionais pelo fato da quebra de ligações e interações fracas, esse fenômeno é chamado de desnaturação, e é irreversível (MONTEIRO; SILVA, 2009).

As enzimas perdem sua atividade catalítica e são desativadas por diferentes motivos, o que acaba acarretando uma certa limitação em vários processos. Pesquisas sobre a inativação são importantes para a compreensão entre a relação função e estrutura da enzima (NAIDU; PANDA 2003).

Para a inativar as enzimas foram realizados estudos cinéticos de hidrólise enzimática, comprovadas pelas equações de Michaelis-Menten (FIGUEROA;

ZAPATA; GUTIÉRREZ, 2012). Esse sistema foi observado por Victor Henri em 1902, ele apresentou uma teoria quântica da cinética enzimática e mais tarde no ano de 1909 foi proposta por Leonor Michaelis e Maud Leonora Menten, que foi denominada como cinética de HenriMichaelis-Menten. A equação exposta por esses estudiosos é de grande importância nos estudos de enzimologia industrial, pois possibilita a realização de cálculos de medidas e velocidade da ligação entre enzimas e substrato (MONTEIRO; SILVA, 2009).

As enzimas são sensíveis a temperatura, quando ocorre o aumento da temperatura durante a hidrólise a enzima perde atividade biocatalítica, acarretando a perda da atividade mediante a inativação. Ao final da hidrólise enzimática deve-se realizar a inativação da enzima, essa etapa pode ser realizada por meio de temperatura elevada, ou alteração no pH (GONÇALVES, 2011). Para a inativação da enzima por temperatura recomenda-se de 80 °C a 90 °C por 10 a 20 minutos (SILVA; MACALTA, 2005).

A variável pH deve ser estudada em processos de hidrólise enzimática de proteínas utilizando diferentes enzimas e substratos (LASSÉ et al., 2015). É um fator importante para a ação das enzimas dentro da temperatura e pH ótimo (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; O'CONNELL et al., 2006). Deve ser ajustado conforme o recomendado para cada enzima (GONÇALVES, 2011).

O pH apresenta efeito na atividade, pelo fato das enzimas serem formadas por grupos químicos, na grande parte por aminoácidos que sofrem ionização e obtêm cargas momentâneas, gerando uma modificação conformacional do arranjo da enzima (MONTEIRO; SILVA, 2009).

A relação enzima/substrato deve ser cuidadosamente avaliada, é de grande importância em relação a velocidade e na produção de peptídeos ao final da hidrólise enzimática (GUO; PAN; TANOKURA, 2009). A redução da relação enzima/substrato pode contribuir para a formação de peptídeos em larga escala (BIASUTTI, 2006).

A agitação mecânica também deve ser controlada dentro de uma reação, conforme cada tipo de substrato e enzima utilizada, pois a agitação apresenta influência na estabilidade enzimática causando mudanças no resultado final (COLOMBIÉ; GAUNAND; LINDET, 2001).

O maior problema enfrentado pelas indústrias é a obtenção de enzimas tolerantes a algumas condições dos processos como variações de pH e temperatura,

que são considerados fatores fundamentais dentro das reações hidrolítica (MONTEIRO; SILVA, 2009).

O sítio ativo da enzima proporciona a interação com o substrato utilizado, com a finalidade de agilizar a reação. A determinação e conhecimento do sítio ativo da enzima é de grande importância para o processo, pois a reação enzimática depende desse conhecimento. Esse procedimento por ser realizado por estudos da cinética da reação (POLGÁR, 2005).

## 2.4 AVALIAÇÕES DA HIDRÓLISE

### 2.4.1 Porcentagem de matéria hidrolisada

A hidrólise enzimática é uma técnica que se apresenta como uma alternativa interessante para o destino de diversos materiais oriundos das agroindústrias, sendo possível gerar um produto com valor agregado. Deve-se verificar a eficiência do processo de hidrólise, para tanto uma das maneiras é a avaliação da quantidade de matéria não hidrolisada ou matéria hidrolisada, o resíduo que as enzimas não conseguem degradar, pois esse substrato não hidrolisado pode acumular afetando negativamente o sistema, afetando a capacidade de trabalhar em sistemas contínuos, com controle do produto final e havendo a necessidade de destinação do produto não hidrolisado (DEESLIE; CHERYAN 1981).

### 2.4.2 Nitrogênio recuperado

A análise de nitrogênio é realizada pelo método de Kjeldahl. Esse método tem como principal objetivo a decomposição da matéria orgânica pelo processo de digestão a uma temperatura de 400 °C com a adição de ácido sulfúrico, e com o acréscimo de um catalisador que faz com que oxidação da matéria orgânica ocorra mais rapidamente. Para se determinar a quantidade de nitrogênio realiza-se destilação por arraste para a quantificação e após efetua-se titulação com ácido diluído (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). Com a análise do nitrogênio do material a ser submetido ao processo de hidrólise e a análise do hidrolisado em diferentes tempos é possível calcular o nitrogênio recuperado e fazer uma análise da cinética de liberação de nitrogênio do material para o hidrolisado.

#### 2.4.3 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise pode interferir nas características funcionais do produto, como por exemplo formação de espuma, retenção de água, a emulsificação e a solubilidade de produto final. O tempo de hidrólise prolongado ou um aumento na concentração de enzima/substrato acaba reduzindo o comprimento médio da cadeia de peptídeos da fração solúvel (proteína hidrolisada). Por outro lado, um aumento no processo de hidrólise acarreta a formação de peptídeos solúveis com características funcionais indesejáveis (DINIZ; MARTIN, 1997).

#### 2.4.4 Matéria seca e cinzas do resíduo

A determinação de matéria seca é realizada por meio de aquecimento do material para que a água presente na amostra seja removida. O resíduo resultante do aquecimento é denominado de matéria seca, e para essa realização é utilizado temperaturas de 105 °C. A umidade representa a quantidade de água presente em um determinado material (IAL, 1985).

Cinzas é a denominação dada ao resíduo resultante do aquecimento de um material em elevadas temperaturas em torno de (550-600°C). Este resíduo nem sempre corresponde a toda substância inorgânica existente na amostra, devido a ocorrência de alguns sais sofrerem volatilização ou redução durante o aquecimento (IAL, 1985).

#### 2.4.5 Proteína bruta final

A proteína bruta é determinada através da medida total de nitrogênio utilizando um fator de conversão de 6,25 que geralmente é o valor aplicado para proteína animal. A elevada concentração de proteína presente no hidrolisado faz com que o produto se torne diferenciado, pelo fato das proteínas serem consideradas elementos fundamentais contendo aminoácidos essenciais (GIESE, 1994).



## 2.5 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A Metodologia de Superfície de Resposta é uma ferramenta relevante no procedimento para obtenção de um produto. É um conjunto de dados que permite ao pesquisador do experimento a otimização de técnicas, sendo possível determinar a relação entre a resposta e as variáveis independentes (EREN; KAYMAK-ERTEKIN, 2007).

A metodologia de superfície de resposta é utilizada em processos bioquímicos e químicos. Alguns exemplos usados em procedimentos bioquímicos são: técnicas de hidrólises, elaboração de proteases alcalinas e sínteses enzimática de ésteres graxos. A metodologia de superfície de resposta não é uma técnica utilizada somente para otimização, mas para determinação da cinética de enzimas (BAS; BOYACI, 2007).

É uma metodologia amplamente utilizada na otimização em processos na indústria alimentícia. É um procedimento matemático e estatístico com o objetivo de estudar a influência de inúmeros aspectos (variáveis independentes) em relação a uma ou mais respostas (variáveis dependentes). Esse sistema estabelece uma correlação matemática eficiente em caracterizar o procedimento em execução (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica eficaz para a otimização de propriedades na elaboração de alimentos dentro da indústria. É possível a variação concomitante de diferentes fatores (variáveis independentes), antecipadamente combinados por sua ação nas características do processo (variáveis dependentes). Empregando sistemas matemáticos e estatísticos, as respostas experimentais apresentam uma combinação de níveis de condições dentro de uma região considerada ótima (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2002) e (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

É uma técnica bastante aplicado, permite destacar mais de um fator ao mesmo tempo e observar a interação entre os parâmetros incluídos no estudo (FREUND; LITTELL, 2000). É composta de vários métodos matemáticos e estatísticos que são utilizados para moldar e verificar problemas cujo se quer respostas inspirados por determinadas variáveis sendo que a finalidade é a otimização da resposta através da modificação das variáveis de entrada (MONTGOMERY, 2005).

É uma técnica satisfatória quando se tem uma boa compreensão do procedimento o qual se almeja otimizar. O estudo de superfície de resposta é realizado

em condições de uma superfície já ajustada, pois quando se possui um ajuste apropriado, o estudo será similar à análise da superfície original (MONTGOMERY, 2005).

Com base neste levantamento bibliográfico, o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade técnica do uso ou não de enzimas exógenas na degradação de tecido animal em solução aquosa, estabelecendo as melhores condições para a hidrólise deste tipo de substrato. Para esse processo a enzima escolhida foi a Alcalase, sendo essa uma das proteases mais utilizadas em proteína animal. Nos ensaios em que se utilizou enzima obteve-se uma reação mais rápida em relação aos ensaios em que não se utilizou concentrações de enzimas, obtendo-se respostas interessantes para o objetivo deste estudo. A escolha pela uso da metodologia de superfície de resposta foi devido o interesse de se avaliar os resultados por meio da interação dos parâmetros estudados.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para o planejamento estatístico do estudo utilizou-se delineamento composto central rotacional (DCCR), com pontos axiais ( $\alpha = (2^n)^{1/4}$ ). Na (TABELA 1) encontra-se as especificações dos níveis reais e codificados das variáveis independentes estudados no primeiro experimento.

TABELA 1 - ESPECIFICAÇÕES DOS NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO DCCR PARA HIDRÓLISE.

Variáveis	Níveis				
	-1,41 (- $\alpha$ )	-1	0	1	1,41 (+ $\alpha$ )
pH	X1 6,09	6,50	7,50	8,50	8,91
Temperatura (°C)	X2 49,40	52,5	60,0	67,5	70,6

( $\alpha$ ): Pontos axiais calculado por  $\alpha = (2^n)^{1/4}$ , com  $n=2$ .  
 FONTE: A autora (2018).

Após a determinação dos níveis das variáveis independentes, elaborou-se a matriz do planejamento DCCR, com os valores reais (utilizados nos ensaios) e codificados (utilizados na análise estatística) das variáveis independentes, totalizando doze ensaios realizados. A matriz do planejamento DCCR é apresentada na (TABELA 2).

TABELA 2 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO DCCR COM OS VALORES REAIS E CODIFICADOS DAS VÁRIAVEIS INDEPENDENTES: PH E TEMPERATURA.

Ensaio	Codificados			Reais	
	pH	Temperatura		pH	Temperatura
	---	(°C)		---	(°C)
1	-1	-1	2 <sup>2</sup>	6,5	52,5
2	1	-1		6,5	67,5
3	-1	1		8,5	52,5
4	1	1		8,5	67,5
5	-1,41	0	Axiais	6,09	60,0
6	1,41	0		8,91	60,0
7	0	-1,41		7,5	49,4
8	0	1,41		7,5	70,6

continua

TABELA 2 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO DCCR COM OS VALORES REAIS E CODIFICADOS DAS VÁRIÁVEIS INDEPENDENTES: PH E TEMPERATURA.

					conclusão
9	0	0	Centrais	7,5	60,0
10	0	0		7,5	60,0
11	0	0		7,5	60,0
12	0	0		7,5	60,0

FONTE: A autora (2018).

Para o planejamento estatístico do estudo utilizou-se delineamento composto central rotacional (DCCR), com pontos axiais ( $\alpha = (2^n)^{1/4}$ ). Na (TABELA 3) encontra-se a matriz de planejamento dos níveis reais e codificados das variáveis independentes estudadas no segundo experimento.

TABELA 3 – ESPECIFICAÇÕES DOS NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO DCCR.

Variáveis	Níveis					
		-1,68 (-α)	-1	0	1	1,68 (+α)
pH	X1	5,82	6,50	7,50	8,50	9,18
Temperatura (°C)	X2	47,4	52,5	60,0	67,5	72,6
Concentração de enzima kg/ton	X3	0.50	1.30	2.50	3.70	4.50

( $\alpha$ ): Pontos axiais calculado por  $\alpha = (2^n)^{1/4}$ , com  $n=3$ .

FONTE: A autora (2018).

Após a determinação dos níveis das variáveis independentes, elaborou-se a matriz do planejamento DCCR, com os valores reais (utilizados nos ensaios) e codificados (utilizados na análise estatística) das variáveis independentes, totalizando os dezoito ensaios realizados. A matriz do planejamento DCCR é apresentada na (TABELA 4). A porcentagem de matéria hidrolisada (%), nitrogênio recuperado (%) e o grau de hidrólise (%) foram as variáveis dependentes. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e em ordem aleatória para minimizar o efeito de variações das respostas, devido a erros sistemáticos.

A porcentagem de matéria hidrolisada (%), nitrogênio recuperado (%) e o grau de hidrólise (%) foram as variáveis dependentes. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e em ordem aleatória para minimizar o efeito de variações das respostas, devido a erros sistemáticos.

TABELA 4 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO DCCR COM OS VALORES REAIS E CODIFICADOS DAS VÁRIAS INDEPENDENTES: ENZIMA, PH E TEMPERATURA.

Ensaio	Codificados				Reais		
	Enzima	pH	Temperatura		Enzima (Kg/t)	pH	Temperatura °C
1	-1	-1	-1	2 <sup>2</sup>	1,30	6,50	52,5
2	-1	-1	1		1,30	6,50	67,5
3	-1	1	-1		1,30	8,50	52,5
4	-1	1	1		1,30	8,50	67,5
5	1	-1	-1		3,70	6,50	52,5
6	1	-1	1		3,70	6,50	67,5
7	1	1	-1		3,70	8,50	52,5
8	1	1	1		3,70	8,50	67,5
9	-1,68	0	0	Axiais	0,50	7,50	60,0
10	1,68	0	0		4,50	7,50	60,0
11	0	-1,68	0		2,50	5,82	60,0
12	0	1,68	0		2,50	9,18	60,0
13	0	0	-1,68		2,50	7,50	47,4
14	0	0	1,68		2,50	7,50	72,6
15	0	0	0	Centrais	2,50	7,50	60,0
16	0	0	0		2,50	7,50	60,0
17	0	0	0		2,50	7,50	60,0
18	0	0	0		2,50	7,50	60,0

FONTE: A autora (2018).

### 3.2 LOCALIZAÇÃO

Os experimentos de hidrólise foram realizados no laboratório TEC-DAM e as análises bromatológicas no laboratório físico-químico, ambos na Embrapa Suínos e Aves, localizada em Concórdia - SC.

### 3.3 MATERIAL

Utilizou-se para os experimentos dois suínos não eviscerados, com peso médio de 25 kg e 63 dias de idade oriundos das granjas da Embrapa Suínos e Aves. Os animais foram triturados três vezes em triturador de suínos (modelo TBR-02 S da marca TBR - Trituradores Brasil). Em seguida, foi processado em um moedor de carne industrial, sem placa porosa. O material foi conduzido a uma misturadora de massas da (marca Confrimaq) por 20min. O material moído foi pesado em uma balança de precisão (marca Bel, modelo KL 16001), dividido em alíquotas de aproximadamente 150 g, embalados em sacos plásticos e armazenados em câmara fria de

congelamento a uma temperatura de -10 °C. Esse material inicial apresentava valores na base natural de 27,93% de matéria seca (MS), 2,28% de cinzas (CZ) e 15,05% de proteína bruta (PB).

### 3.4 ENZIMA

No primeiro experimento não se utilizou concentrações de enzimas, no segundo experimento utilizou-se diferentes concentrações da enzima Alcalase 2.5L® (número EC 3.4.21.62) fabricada pela empresa *Novozymes* (Bagsvaerd, Dinamarca), classificada como uma endopeptidase de *Bacillus licheniformis*, possuindo atividade específica de 2.5 Unidades Anson (AU) por grama. Uma Unidade Anson corresponde a um miliequivalente de tirosina liberada da hidrólise de hemoglobina por minuto.

De acordo com ficha técnica da Alcalase as condições ótimas de atividade para a enzima em relação a temperatura é entre 55,0 °C a 70,0 °C, dependendo do tipo de substrato, o pH entre 6,5 e 8,5 e a concentração entre 1,0 a 3,0 kg de enzima por tonelada de material a ser hidrolisado. Para a inativação da Alcalase recomenda-se temperatura de 90,0 °C por 10 minutos ou a 85,0 °C por 15 minutos.

### 3.5 HIDRÓLISE

O material cárneo congelado foi transferido para frasco plástico limpo, identificado e pesado. Em seguida os frascos foram cobertos com papel alumínio e armazenados em refrigeração (24h) a uma temperatura aproximada de 5,0 °C até se iniciar o processo de hidrólise.

Após armazenagem os frascos eram retirados da refrigeração, a tampa de papel alumínio removida e os frascos mais o substrato eram pesados. Adicionava-se 300 mL de água tipo II pré-aquecida em banho termostatizado (Q215M da marca Quimis) a uma temperatura de 47,4 °C.

O pH inicial era ajustado com NaOH 10M ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N, utilizando-se um pHmetro/conduvímeter HI 9813-6 (Hanna Instruments). Sendo que não houve ajuste de pH no decorrer do processo de hidrólise.

Utilizou-se um banho-maria com movimento recíproco (Dubnoff MA 095/RE) com 100 rotações por minuto (RPM), e temperatura conforme cada ensaio estabelecido pelo planejamento experimental.

Para cálculo de porcentagem de matéria hidrolisada e análises, os frascos eram pesados e a matéria sólida peneirada, por meio de peneira plástica, nos tempos de 1, 2, 6, 12, 24 e 48h após início da hidrólise. Pesava-se a matéria sólida retida e da fração líquida coletava-se 15 mL e armazenava-se em tubos tipo *Falcon*. Após as amostras eram armazenadas em refrigeração a temperatura aproximada de 5,0 °C. Posteriormente, para o hidrolisado, eram realizadas as análises: nitrogênio recuperado e grau de hidrólise no hidrolisado. Na última coleta (48h) os resíduos sólidos foram coletados, pesados e armazenados em sacos plásticos devidamente identificados para após serem realizadas análises de matéria seca e cinzas do resíduo final.

### 3.6 VARIÁVEIS AVALIADAS NO PROCESSO

#### 3.6.1 Matéria hidrolisada

O resíduo não hidrolisado retido na peneira era pesado em cada coleta, nos tempos 1, 2, 6, 12, 24 e 48h. Por meio do valor de massa foi realizado o cálculo de porcentagem de matéria hidrolisada para cada coleta em relação ao peso inicial da amostra que era de aproximadamente 150 gramas, utilizando a equação (1):

Em que:

$$\% \text{ de Matéria hidrolisada} = 100 - \frac{M.R}{M.I} \times 100 \quad (1)$$

R = Massa do resíduo não hidrolisado (g)

M = Massa inicial da amostra (g)

#### 3.6.2 Nitrogênio recuperado no hidrolisado

Para a determinação de nitrogênio recuperado no hidrolisado utilizou-se o método Kjeldahl. Nos diferentes tempos, realizava-se a correção da alíquota retirada de cada ensaio nos tempos anteriores (1, 2, 6, 12, 24 e 48h) do hidrolisado. O nitrogênio recuperado no hidrolisado é expresso em porcentagem conforme a equação (2):

Em que:

$$\text{Recuperação de N} = \frac{M.H \times N.H}{M.I \times N.I} \times 100 \quad (2)$$

M.H = Massa do hidrolisado (g)

N.H = Nitrogênio do hidrolisado (mg/kg)

M.I = Massa inicial da amostra (g)

N.I = Nitrogênio inicial da amostra (mg/kg)

### 3.6.3 Grau de hidrólise do hidrolisado

Para determinar o grau de hidrólise realizou-se primeiramente a desnaturação com ácido tricloroacético (TCA) 10%, com uma diluição de 5 mL de amostra para 25 mL de TCA, após centrifugou-se por 10 min a 3000 (rpm). A quantidade de nitrogênio solúvel presente na amostra foi determinada pelo método de Kjeldahl. Para determinação do grau de hidrólise nos diferentes tempos, realizava-se a correção da alíquota retirada de cada ensaio nos tempos anteriores (1, 2, 6, 12, 24 e 48h) na massa do hidrolisado. O grau de hidrólise é expresso em porcentagem conforme a equação (3):

Em que:

$$\% \text{ GH} = \frac{M.H \times N.S.H}{M.I \times N.I} \times 100 \quad (3)$$

M.H = Massa do hidrolisado (g)

N.S.H = Nitrogênio solúvel em TCA do hidrolisado (mg/kg)

M.I = Massa inicial da amostra (g)

N.I = Nitrogênio inicial da amostra (mg/kg)

### 2.6.4 Matéria seca do resíduo não hidrolisado 48h

Foi determinada por secagem em estufa a 105 °C por 15h, de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz, (2008), obtendo-se a porcentagem de matéria seca (%MS) pelo seguinte cálculo da equação (4):

Em que:

$$\% \text{ MS} = \frac{M.I - M.F}{M.I} \times 100 \quad (4)$$



M.I = Massa da amostra (g)

M.F = Massa final da amostra (g)

### 3.6.5 Cinzas do resíduo não hidrolisado 48h

Definida por incineração em mufla a 550 °C por 4h, conforme metodologia presente (IAL, 2008). Obteve-se a porcentagem de cinzas por meio da equação (5):

Em que:

$$\% \text{ de Cinzas} = \frac{C}{M} \times 100 \quad (5)$$

C = Massa de cinzas (g)

M = Massa da amostra (g)

### 3.6.6 Análise estatística

Os dados experimentais para o primeiro teste foram analisados utilizando análise de regressão múltipla usando o programa Software STATISTICA versão 8.0 (StatSoft Inc®, USA). A regressão foi feita em um modelo de 2ª ordem para cada resposta. O modelo pode ser expresso com variáveis codificadas ( $X^1$ ,  $X^2$ ) como a equação (6):

$$Y = B_0 + B_1X^1 + B_2X^2 + B_{11}X^{1^2} + B_{22}X^{2^2} + B_{12}X^1X^2 + \varepsilon \quad (6)$$

Em que Y representa a variável dependente,  $B_0$  é a constante,  $B_i$ ,  $B_{ii}$ ,  $B_{ij}$  são coeficientes estimados pelo modelo. Os coeficientes de regressão para os termos lineares, quadráticos,  $\varepsilon$ , e de interação foram determinados usando regressão linear múltipla. A significância de cada coeficiente de regressão foi analisada estatisticamente pelo cálculo do teste de F e do seu correspondente valor p.

No segundo experimento os dados foram avaliados utilizando análise de regressão múltipla usando o programa Software STATISTICA versão 8.0 (StatSoft Inc®, USA). O Ajuste foi feito em um modelo de 2ª ordem para cada resposta. O modelo pode ser expresso com variáveis codificadas ( $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$ ) como a equação (7):

$$Y = B_0 + B_1X^1 + B_2X^2 + B_3X^3 + B_{12}X^1X^2 + B_{13}X^1X^3 + B_{23}X^2X^3 + B_{11}X^{1^2} + B_{22}X^{2^2} + B_{33}X^{3^2} + \varepsilon \quad (7)$$

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para validar o modelo pelo teste do ajuste. Os coeficientes de regressão foram usados então para determinar o modelo de 2ª ordem.

O ponto ótimo máximo para matéria hidrolisada (%) foi determinado pelo modelo Broken-line, (ROBBINS, 1986), utilizando o procedimento PROC NLIN do SAS™ (2012).

## 4 ANÁLISE DE RESULTADOS

### 4.1 MATÉRIA HIDROLISADA

Os valores de matéria hidrolisadas foram determinados por meio do massa da matéria hidrolisada no decorrer do processo, e a porcentagem obtida nos ensaios em que foram avaliadas as variáveis temperatura, pH e tempo de reação podem ser visualizados na (TABELA 5). Nota-se que os valores encontrados para a hidrólise sem o uso de enzimas após 48h do início da reação, variaram de 73,40% a 89,80%. Maiores valores de matéria hidrolisada (%), foram encontrados nos ensaios em que se utilizou as temperaturas entre 52,5 °C e 60,0 °C. Quando se manipulou temperatura de 60,0 °C os valores variaram de 80,79% a 85,50%. Ensaios em que a temperatura utilizada foi 52,5 °C os valores de matéria hidrolisada foram de 84,01% e 89,80%.

Os menores resultados encontrados para matéria hidrolisada foram em ensaios que se utilizou a menor e a maior temperatura (49,4 °C e 70,6 °C), resultando em 73,40% e 74,36% respectivamente, percebe-se que a temperatura teve efeito importante para essa variável. Outra questão importante é o fato de que ao trabalhar com as temperaturas de 49,4 °C e 52,5 °C após as 12h o material apresentava odor característico de putrefação. Verificou-se que os valores foram relevantes para essa variável, tendo em vista que nos ensaios não se adicionou enzimas, constando que a temperatura foi um fator de grande importância para os resultados obtidos.

TABELA 5. MATÉRIA HIDROLISADA (%) OBTIDA EM CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DE SUÍNOS MORTOS E NÃO ABATIDOS.

continua

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Matéria hidrolisada H (%)						
			1h	2h	6h	12h	24h	48h	Broken-line (h)
1	6,50	52,5	20,72	23,12	32,98	43,58	66,25	84,01	32,81
2	6,50	67,5	41,77	54,56	65,11	71,35	73,92	76,56	7,92
3	8,50	52,5	11,20	13,16	24,39	49,40	81,71	89,80	26,12
4	8,50	67,5	47,53	62,93	70,78	74,87	76,15	78,26	7,12
5	6,09	60,0	42,62	56,52	67,61	75,76	78,86	82,40	8,37

TABELA 5. MATÉRIA HIDROLISADA (%) OBTIDA EM CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DE SUÍNOS MORTOS E NÃO ABATIDOS.

									conclusão
6	8,91	60,0	37,85	55,96	72,23	78,58	82,36	85,50	7,41
7	7,50	49,4	13,67	16,89	25,72	29,88	40,59	73,40	Ns
8	7,50	70,6	45,10	58,64	67,27	70,31	72,45	74,36	7,06
9	7,50	60,0	37,15	44,67	67,18	75,80	79,19	83,16	8,04
10	7,50	60,0	38,22	44,50	63,92	73,04	77,11	80,79	8,55
11	7,50	60,0	34,83	56,80	69,86	74,24	78,53	81,25	7,07
12	7,50	60,0	42,00	62,93	73,20	75,04	79,71	83,65	6,87

FONTE: A autora (2018).

Em processos de hidrólise as variáveis temperatura, tempo de reação e pH devem ser previamente avaliadas antes de se iniciar a reação. No presente estudo a temperatura e o tempo de reação foram de grande importância para os resultados obtidos. Na maioria dos ensaios os resultados já eram satisfatórios em 12h de processo, exceto para os ensaios em que a temperatura utilizada foi de 49,4 °C, que se tornou eficiente próximo a 48h de processo. Já para os ensaios a 52,5 °C, observou-se que o percentual de proteína hidrolisada tornou-se mais expressivo após 24h. Os resultados para a temperatura 52,5 °C, também se tornou mais relevante após 24h de reação.

Nota-se que os resultados em 12h foram eficientes para ensaios em que a temperatura utilizada foi entre 60,0 °C, 67,5 °C e 70,6 °C, pelo fato de temperaturas mais elevadas tornam o processo mais rápido para essa enzima. Sendo que a matéria hidrolisada a 48h utilizando as temperaturas de 67,5 °C e 70,6 °C foram inferiores a 60,0 °C.

Os ajustes de pH, não apresentaram diferença significativa para este estudo, não alterando as respostas obtidas. Isto pode ser explicado pelo fato do ajuste de pH ter sido realizado somente ao início da reação, não sendo ajustado no decorrer da hidrólise. O objetivo inicial era analisar o processo de hidrólise sem ajustar o pH, visando desenvolver um processo de menor complexidade. O pH está relacionado diretamente ao tipo de hidrolisado obtido ao final da reação e sua aplicação, tendo em vista se o hidrolisado for aplicado em indústrias alimentícias essa variável deve ser cuidadosamente avaliada.

A influência da temperatura em uma reação de hidrólise pode ser conhecida em fases diferentes, elevada temperatura ocasiona um aumento na velocidade do

processo, pois gera um aumento na energia cinética das moléculas. Com isso, pode-se explicar que mesmo em temperaturas mais elevadas ocorre um aumento da constante de hidrólise. A segunda seria a desnaturação de possíveis enzimas no meio com redução da atividade enzimática do processo (KUROZAWA; PARK; HUBINGER 2008).

O ponto ótimo para matéria hidrolisada foi determinado pelo modelo Broken-line, que permite identificar o tempo em que a reação atinge o ponto máximo e também permite identificar o platô, que pode resultar em níveis que promovam a queda ou estabilização no desempenho do processo, o nível ótimo é determinado pelo ponto de quebra. É uma técnica que permite o pesquisador obter uma compreensão quando ocorreu o ponto ótimo em uma reação.

Os valores encontrados podem ser observados na (TABELA 5). Os tempos variaram de 6,87h a 32,81h. Os maiores tempos 32,81h e 26,12h foram identificados nos ensaios em que a temperatura utilizada foi de 52,5 °C, e nota-se que a menor temperatura testada 49,4 °C o resultado não apresentou platô. Para esta constatação a temperatura também foi muito importante, e que as temperaturas mais baixas não se apresentaram eficiente nos tempos iniciais. Nos ensaios em que se utilizou temperaturas de 60,0 °C, 67,5 °C e 70,6 °C, valores variaram de 6,87h a 8,55h, os mais baixos detectados para esta variável.

Verificou-se que a máxima resposta para matéria hidrolisada por meio deste modelo revela que em 1h de reação o nível ótimo aconteceu em temperatura de 62,17 °C, para uma máxima produção de 41,54%, e em 6h de processo a temperatura foi de 65,62 °C resultando em valores de 75,17%, e em 48h a temperatura de 58,12 °C resultando em 82,10% de matéria hidrolisada.

As equações para o modelo matemático obtidos a partir dos valores de matéria hidrolisada de suínos mortos não abatidos são apresentados na (TABELA 6). Observa-se que o modelo se ajustou aos dados experimentais, com valores de coeficientes de variação ( $R^2$ ) acima de 68%. Os efeitos dos fatores lineares e quadráticos também são expostos na (TABELA 6), verificando que para o parâmetro temperatura quadrática ( $T^2$ ), os resultados foram significativos a 95% de confiança ( $p < 0,05$ ) nos horários de coletas até 24h.

TABELA 6. EQUAÇÕES DE REGRESSÃO REPRESENTANDO A SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS EXPERIMENTOS PARA MATÉRIA HIDROLISADA (%) DE SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS.

Tempo (h)	Equação MH = (Matéria Hidrolisada %)	R <sup>2</sup>	Erro Padrão	Efeito Significativo*
1	$MH = -176,30 - 31,26 \cdot pH - 0,041 \cdot pH^2 + 9,52 \cdot T - 0,097 \cdot T^2 + 0,509 \cdot pH \cdot T$	0,946	14,93	T, T <sup>2</sup>
2	$MH = -418,98 - 34,69 \cdot pH - 0,151 \cdot pH^2 + 17,74 \cdot T - 0,166 \cdot T^2 + 0,611 \cdot pH \cdot T$	0,871	83,98	T, T <sup>2</sup>
6	$MH = -823,44 - 0,953 \cdot pH - 1,808 \cdot pH^2 + 27,51 \cdot T - 0,240 \cdot T^2 + 0,475 \cdot pH \cdot T$	0,922	50,40	T, T <sup>2</sup>
12	$MH = -906,12 + 0,930 \cdot pH + 0,355 \cdot pH^2 + 30,52 \cdot T - 0,234 \cdot T^2 - 0,076 \cdot pH \cdot T$	0,986	6,50	T, T <sup>2</sup>
24	$MH = -661,00 - 8,10 \cdot pH + 2,49 \cdot pH^2 + 24,52 \cdot T - 0,171 \cdot T^2 - 0,441 \cdot pH \cdot T$	0,773	54,02	T <sup>2</sup>
48	$MH = -92,33 - 15,76 \cdot pH + 1,69 \cdot pH^2 + 7,89 \cdot T - 0,060 \cdot T^2 - 0,136 \cdot pH \cdot T$	0,681	13,27	Ns

R<sup>2</sup>= coeficiente de determinação; \* p value < 0,05. T= Temperatura; T<sup>2</sup>= Temperatura quadrática; E\*T= Interação enzima e temperatura

FONTE: A autora (2018).

Em estudos realizados por Oliveira et al. (2015), obtiveram valores de matéria hidrolisada de 86,13% quando utilizaram enzima Papaína Látex-1,5 units/MG em temperatura de 60,0 °C, quando utilizaram a Flavourzyme 1 LAPU/g em temperatura de 50,0 °C encontraram valores de 58,20% e quando utilizaram a enzima Protamax 1,5 AU-NH/g, a 50 °C, os resultados foram de 78,03%, em 2h de reação.

Neste estudo, os valores para matéria hidrolisada em 2h de reação variaram entre 13,16% a 62,93%, sem uso de enzima em diferentes temperaturas. Nos ensaios em que a temperatura utilizada foi de 60,0 °C os valores variaram entre 44,50% a 62,93% em 2h de reação, valores consideráveis uma vez que não houve a utilização de enzima, sendo possível notar que os resultados foram próximos aos encontrados pelos autores quando utilizaram a enzima Flavourzyme.

Nos ensaios em que a temperatura usada foi de 52,5 °C os valores foram de 13,16% e 23,12% e na temperatura de 49,4 °C obteve-se 16,89%, considerando que nestes ensaios em que se utilizou temperaturas mais baixas, em 48h os resultados foram bem eficientes, pelo fato de não se adicionar enzima.

A melhor condição para matéria hidrolisada foi em temperaturas de 52,5 °C e 60,0 °C, e em 12h o processo atingiu o equilíbrio para a maioria dos ensaios.

## 4.2 NITROGÊNIO RECUPERADO

Os valores para nitrogênio recuperado podem ser visualizados na (TABELA 7). Verifica-se que em 48h os valores encontrados foram de 75,72% a 89,38%. Os maiores resultados foram detectados nos ensaios em que a temperatura utilizada foi de 52,5 °C e 60,0 °C. Um dos menores valores (76,98%), foi encontrado no ensaio em que a temperatura aplicada foi de 70,6 °C. Para esse parâmetro em alguns ensaios o interessante seria conduzi-los até 48h, em outros os resultados se mostraram bem eficientes em 12h.

O menor valor encontrado em 1h para nitrogênio recuperado foi no ensaio em que se utilizou a menor temperatura 49,4 °C, resultando em 22,70%, isso demonstra que a temperatura de reação é uma variável relevante para a resposta nitrogênio recuperado de um hidrolisado.

TABELA 7. VARIÁVEL RESPOSTA NITROGÊNIO RECUPERADO (%) PARA ENSAIOS DE HIDRÓLISE EM SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS UTILIZANDO A ENZIMA ALCALASE.

Experimentos	pH	Temperatura (°C)	Nitrogênio recuperado (%)					
			1h	2h	6h	12h	24h	48h
1	6,50	52,5	27,24	29,46	37,58	46,39	68,26	83,86
2	6,50	67,5	40,29	49,82	63,02	70,39	73,70	75,84
3	8,50	52,5	32,25	34,40	43,34	57,69	82,39	89,38
4	8,50	67,5	44,73	57,86	68,46	72,77	75,12	77,25
5	6,09	60,0	42,14	56,43	69,74	75,53	79,89	82,38
6	8,91	60,0	43,18	58,59	72,28	80,88	82,62	83,72
7	7,50	49,4	22,70	27,07	33,86	39,86	50,21	77,00
8	7,50	70,6	41,99	55,82	66,66	71,24	74,64	76,98
9	7,50	60,0	38,20	47,76	65,21	73,82	79,72	82,28
10	7,50	60,0	37,55	45,42	64,71	73,51	79,11	75,72
11	7,50	60,0	34,10	48,59	65,53	69,39	75,64	81,64
12	7,50	60,0	42,26	58,41	70,20	70,78	78,94	82,27

FONTE: A autora (2018).

As equações para o modelo matemático obtidos a partir dos valores de nitrogênio recuperado são apresentados na (TABELA 8), sendo que o modelo se ajustou aos dados experimentais, com valores de coeficientes de variação ( $R^2$ ) acima de 53%. Os efeitos significativos dos fatores lineares e quadráticos também são expostos na (TABELA 8), verificando que para temperatura quadrática ( $T^{A2}$ ) os resultados foram significativos a 95% de confiança ( $p < 0,05$ ), em todas as coletas exceto para 48h, que não nenhum fator foi significativo.

TABELA 8. EQUAÇÕES DE REGRESSÃO REPRESENTANDO A SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS ENSAIOS PARA NITROGÊNIO RECUPERADO EM SUÍNOS MORTOS E NÃO ABATIDOS.

Tempo (h)	Equação NR = Nitrogênio recuperado (%)	R <sup>2</sup>	Erro Padrão	Efeito significativo*
1	$NR = -126,0627,21 \cdot pH + 1,98 \cdot pH^2 + 7,82 \cdot T - 0,057 \cdot T^2 - 0,018 \cdot pH \cdot T$	0,911	7,627	T, T <sup>2</sup>
2	$NR = 266,9435,39 \cdot pH + 2,08 \cdot pH^2 + 13,33 \cdot T - 0,11 \cdot T^2 + 0,10 \cdot pH \cdot T$	0,860	33,27	T, T <sup>2</sup>
6	$NR = -664,13,54 \cdot pH + 0,402 \cdot pH^2 + 22,95 \cdot T - 0,178 \cdot T^2 - 0,011 \cdot pH \cdot T$	0,929	23,75	T, T <sup>2</sup>
12	$NR = -662,35 - 7,94 \cdot pH + 1,89 \cdot P + 23,74 \cdot T - 0,168 \cdot T^2 - 0,297 \cdot pH \cdot T$	0,956	12,25	T, T <sup>2</sup>
24	$NR = -499,615,54 \cdot pH + 2,23 \cdot pH^2 + 19,11 \cdot T - 0,128 \cdot T^2 - 0,424 \cdot pH \cdot T$	0,753	36,07	T <sup>2</sup>
48	$NR = 38,89 - 15,99 \cdot pH + 1,69 \cdot pH^2 + 3,58 \cdot T - 0,024 \cdot T^2 - 0,136 \cdot pH \cdot T$	0,534	14,82	Ns

R<sup>2</sup>= coeficiente de determinação; \* p value < 0,05. T= Temperatura; T<sup>2</sup>= Temperatura quadrática; E\*T= Interação enzima e temperatura

FONTE: A autora (2018).

Em estudos com Cabrinha (*Prionotus punctatus*) utilizando a enzima Alcalase 2.4 AU/g, Santos et al. (2009) detectaram valores para a variável nitrogênio recuperado de 76,1% a 86,1%, quando manipularam a reação em temperatura de 60,0 °C em 1h de hidrólise, neste estudo os valores para essa temperatura sem o uso de enzima foram de 34,10% a 43,18%.

Para nitrogênio recuperado as maiores resultados foram encontrados em condições de temperatura de 52,5 °C e 60,0 °C, nessas condições os valores de nitrogênio recuperado em relação a porcentagem de nitrogênio inicial do material foi maior.

#### 4.3 GRAU DE HIDRÓLISE

Os valores de grau de hidrólise para ensaios sem enzimas através da interação temperatura e pH podem ser observados na (TABELA 9). Os resultados para 48h variaram de 36,08% a 71,18%. Notou-se que o menor valor para esse parâmetro foi no ensaio em que se empregou a maior temperatura 70,6 °C, e o maior resultado obtido foi no ensaio em que a temperatura utilizada foi 52,5 °C.



TABELA 9. RESPOSTA APRESENTADA PARA GRAU DE HIDRÓLISE (%) DE SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Grau de hidrólise (%)					
			1h	2h	6h	12h	24h	48h
1	6,50	52,5	11,98	14,45	22,33	30,90	44,29	58,60
2	6,50	67,5	22,37	27,80	33,96	37,53	39,80	42,29
3	8,50	52,5	15,30	17,97	26,33	37,17	59,80	71,18
4	8,50	67,5	21,54	28,65	34,47	37,70	39,72	41,77
5	6,09	60,0	22,19	26,71	34,04	38,43	43,96	52,35
6	8,91	60,0	21,37	27,78	38,36	45,36	49,91	50,19
7	7,50	49,4	11,54	13,41	19,81	24,59	31,07	54,16
8	7,50	70,6	24,34	27,52	30,11	31,44	33,51	36,08
9	7,50	60,0	19,12	24,47	33,00	39,39	43,85	47,27
10	7,50	60,0	18,20	23,24	31,50	35,87	41,32	47,48
11	7,50	60,0	16,25	24,99	38,26	40,65	45,13	46,86
12	7,50	60,0	21,31	30,51	39,97	38,85	42,42	46,60

FONTE: A autora (2018).

As equações para o modelo matemático obtidos a partir dos valores de grau de hidrólise utilizando a Alcalase são apresentados na (TABELA 10), o modelo se ajustou aos dados experimentais, com valores de coeficientes de variação ( $R^2$ ) acima de 67%. Os efeitos significativos dos fatores lineares e quadráticos também são expostos na (TABELA 10), verificando que para a variável temperatura (T) os resultados foram significativos a 95% de confiança ( $p < 0,05$ ) em todos os horários de coletas, exceto para 24h de coleta.

TABELA 10. EQUAÇÕES DE REGRESSÃO REPRESENTANDO A SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS ENSAIOS PARA GRAU DE HIDRÓLISE EM SUÍNOS MORTOS E NÃO ABATIDOS.

Tempo (h)	Equação GH = Grau de hidrólise (%)	$R^2$	Erro Padrão	Efeito Significativo*
1	$GH = 16,14 - 19,06 \cdot pH + 1,83 \cdot pH^2 + 1,81 \cdot T - 0,002 \cdot T^2 - 0,138 \cdot pH \cdot T$	0,895	3,47	T, $pH^2$
2	$GH = -92,04 - 17,84 \cdot pH + 1,59 \cdot pH^2 + 5,25 \cdot T - 0,032 \cdot T^2 - 0,089 \cdot pH \cdot T$	0,964	1,810	$pH^2$ , T, $T^2$
6	$GH = -244,55 - 14,08 \cdot pH + 1,49 \cdot pH^2 + 10,26 \cdot T - 0,073 \cdot T^2 - 0,116 \cdot pH \cdot T$	0,972	1,463	pH, $pH^2$ , T, $T^2$
12	$GH = -309,92 - 13,18 \cdot pH + 1,83 \cdot pH^2 + 12,73 \cdot T - 0,091 \cdot T^2 - 0,204 \cdot pH \cdot T$	0,949	2,668	pH, $pH^2$ , T, $T^2$
24	$GH = -244,54 - 17,99 \cdot pH + 3,48 \cdot pH^2 + 11,82 \cdot T - 0,069 \cdot T^2 - 0,519 \cdot pH \cdot T$	0,679	31,833	ns
48	$GH = 129,60 - 24,47 \cdot pH + 3,45 \cdot pH^2 + 1,35 \cdot T + 0,006 \cdot T^2 - 0,44 \cdot pH \cdot T$	0,850	22,463	T

R<sup>2</sup>= Coeficiente de determinação; \* p value < 0,05. T= Temperatura; T<sup>2</sup>= Temperatura quadrática; pH, pH<sup>2</sup> pH quadrático  
 FONTE: A autora (2018).

O grau de hidrólise é determinado como a porcentagem de ligações peptídicas clivadas (SHAHIDI, 1994). Zavareze et al. (2009) em experimentos utilizando cabrinha (*Prionotus punctatus*), observaram que os valores de grau de hidrólise aumentaram conforme o aumento de tempo de reação, o que corrobora com os resultados encontrados para este estudo. Quando realizaram uma hidrólise enzimática por meio da Alcalase em temperatura de 60,0 °C em 1h de reação encontraram valores de 25,41%, resultados bem semelhantes aos encontrados neste estudo em 1h de reação sem adição de enzima, em que nesta temperatura os valores variaram de 16,25% a 22,19%.

Charoenphun et al. (2012) em estudos de hidrólise após 6h notaram que os valores para grau de hidrólise em reação a 50,0 °C com tilápias (*Oreochromis niloticus*) utilizando a enzima Papaína 1,5 U/mg, e Flavourzyme 1.000L foram de 41,6% e 35,6% respectivamente. Notando que os resultados obtidos por meio da Flavourzyme se aproximou dos encontrados neste estudo em 12h de processo quando utilizado uma temperatura de 52,5 °C que resultou em 30,90% e 37,17%.

Kurozawa, Park e Hubinger (2009), em estudo com carne frango utilizando Alcalase 2.4 AU/g, verificaram que os maiores valores de grau de hidrólise foram obtidos em ensaios que a temperatura utilizada foi de 60,0 °C, com concentração de enzima de 2,5 kg/ton em 6h de hidrólise, visto que esses valores se aproximaram de 40%, valores bem próximos aos encontrados neste estudo que variaram de 31,50% a 39,97% em 60,0 °C em 6h de hidrólise.

Oliveira et al. (2015), em estudos de hidrólise utilizando carcaças de frango desossada e as enzimas Papaína Látex-1,5 units/mg em temperatura de 60,0 °C, Flavourzyme 1000 LAPU/g em 50,0 °C, e Protemax 1,5 AU-NH/g em temperatura de 50,0 °C encontraram valores para grau de hidrólise de 39,25%, 16,72% e 47,12% respectivamente, em 1h de reação, em 2h esses valores foram de 43,19%, 20,25% e 51,31% respectivamente, sendo possível notar que após 1h esses valores pouco alteraram. O parâmetro tempo de hidrólise pode ser determinante para o grau de hidrólise.

Para a variável grau de hidrólise os melhores resultados foram encontrados quando a temperatura usada foi de 52,5 °C e 60,0 °C, notando-se que para esse

parâmetro avaliado temperatura de 49,4 °C e 70,6 °C, resultaram em valores mais baixos que as demais temperaturas.

#### 4.4 MATÉRIA SECA E CINZAS DO RESÍDUO FINAL E PROTEÍNA BRUTA FINAL

Os valores obtidos para matéria seca e cinzas do resíduo final e proteína bruta do hidrolisado líquido, alcançados através da interação entre diferentes temperaturas e ajustes de pH, são apresentados na (TABELA 11).

TABELA 11 - VALORES PARA MATÉRIA SECA (%) E CINZAS DO RESÍDUO E PROTEÍNA BRUTA DO HIDROLISADO COM 48H DE HIDRÓLISE DE SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS EM FUNÇÃO DO PH INICIAL E TEMPERATURA (°C).

Experimentos	pH	Temperatura (°C)	MS (%) Resíduo	CZ (%) Resíduo	PB (%) Hidrolisado LÍq.
1	6,50	52,5	30,77	10,82	5,12
2	6,50	67,5	28,76	7,82	4,60
3	8,50	52,5	31,76	12,1	5,23
4	8,50	67,5	29,45	8,36	4,47
5	6,09	60,0	28,56	6,99	4,79
6	8,91	60,0	31,23	10,94	4,74
7	7,50	49,4	24,99	5,27	4,93
8	7,50	70,6	28,30	6,95	4,58
9	7,50	60,0	29,73	6,42	4,77
10	7,50	60,0	28,90	6,19	4,34
11	7,50	60,0	27,78	6,94	4,92
12	7,50	60,0	41,57	22,97	4,84

Matéria seca (MS), Cinzas (CZ), Proteína Bruta PB.  
FONTE: A autora (2018).

Os valores para matéria seca variaram de 24,99% a 41,57%, constatando que o menor valor encontrado foi no ensaio em que se utilizou a menor temperatura 49,4 °C, e o maior valor 41,57%, foi observado no ensaio em que se utilizou temperatura de 60,0 °C.

Os resultados para cinzas em 48h de processo foram de 5,27% a 22,97%, verificando que o menor resultado também foi constatado no ensaio em que a temperatura manipulada foi a menor 49,4 °C. Já o maior valor 22,97% consequentemente foi detectado no ensaio em que se obteve a maior porcentagem de matéria seca, no qual a temperatura foi de 60,0 °C, para essa variável o valor diferiu significativamente dos demais ensaios com a mesma temperatura. Esse resultado

diferiu dos demais ensaios quando se manipulou a mesma temperatura, e pode ser explicado pela maior presença de ossos e pele na amostra.

Os resultados para proteína bruta no hidrolisado, variaram entre 4,34% a 5,23%, valores bem semelhantes em temperatura e ajustes de pH diferentes, podendo ser verificado que esses valores não apresentaram diferenças significativas entre os ensaios através das interações.

Centenaro e Mellado (2008), encontraram valores de matéria seca em experimentos utilizando corvina através do uso de enzima Alcalase 2.4 AU/g, em temperatura de 50,0 °C, valores entre 7,2% a 13,1%, valores bem menores aos encontrados neste estudo sem o uso de enzimas, para este parâmetro os resultados foram bem interessantes pelo fato de não se aplicar nenhuma concentração de enzima.

Schmidt e Salas-Mellado (2009), em estudos utilizando Alcalase 2.4 AU/g, em ensaios com temperatura de 50,0 °C e 55,0 °C, quando hidrolisaram peito e coxa de frango encontram porcentagem de cinzas de 3,34% e 4,27% respectivamente, valores esses inferiores aos encontrados neste estudo, que em temperatura de 49,4 °C resultou em 5,27% e quando a temperatura aplicada foi de 52,5 °C os valores foram de 10,82% e 12,1%.

Oliveira et al. (2015), em pesquisa com carcaças de frango manualmente desossadas, utilizando a enzima Papaína Látex-1,5 U/mg e temperatura de 60,0 °C, encontraram valores de cinzas de 4,81%, valores bem semelhantes aos encontrados neste estudo sem uso de enzima. Constata-se que o parâmetro temperatura se apresentou positivo sobre essa variável.

## 5 ANÁLISE DE RESULTADOS

### 5.1 MATÉRIA HIDROLISADA

Os valores de porcentagem de matéria hidrolisada (TABELA 12), apresentaram variações nas respostas de acordo com a temperatura e concentração de enzima aplicada. Aparentemente os diferentes ajustes de pH no início da hidrólise não demonstraram influência para esta variável. Ao final do processo (48h), os resultados para matéria hidrolisada dos ensaios variaram de 83,83% a 95,05%.

Os maiores valores de porcentagem de matéria hidrolisada em 48h foram verificados nas condições de hidrólise em que se utilizou concentração de enzima entre 2,50 kg/ton e 3,70 kg/ton, e temperatura entre 60,0 °C e 67,5 °C. Os menores valores foram encontrados nos ensaios em que se utilizou as menores e a maior temperatura testada, (52,5 °C, 47,4 °C e 72,6 °C), originando valores de 83,83%, 85,19% e 85,78% respectivamente. Uma questão importante ao trabalhar com a temperatura de 47,4 °C e 52,5 °C é que após as 12h o material apresentava odor característico de putrefação.

O resultado ao final do processo para a maior concentração de enzima testada (ensaio 10) 4,50 kg/ton, foi de 93,97% de matéria hidrolisada, em temperatura de 60,0 °C, valor semelhante aos encontrados em ensaios em que se utilizou concentração de 2,50 kg/ton, nesta mesma temperatura, percebendo que a concentração mais elevada não se apresentou mais eficiente como se inferia, tornando-se assim um ponto positivo para este processo, proporcionando menores custos em relação a enzima que é um fator economicamente importante para o processo, tendo em vista que no ensaio em que se utilizou concentração de enzima de 0,50 kg/ton o resultado foi de 91,24%.

De acordo com a ficha técnica da enzima Alcalase elaborada pelo fabricante, empresa *Novozymes* apresentada conforme o (APÊNDICE 1), as condições ótimas de atividade desta enzima são: temperatura entre 55,0 °C a 70,0 °C, (dependendo do tipo de substrato), pH entre 6,50 e 8,50 e concentração de enzima entre 1,0 a 3,0 kg/ton. A Alcalase apresenta uma ampla faixa de trabalho das variáveis temperatura, pH e concentração de enzima, os quais devem ser avaliados para cada material a ser hidrolisado. Os valores encontrados levando em consideração a porcentagem de matéria hidrolisada utilizando suínos mortos triturados apresentaram uma faixa mais

restrita de temperatura e concentração de enzima, mas que estão dentro das faixas recomendadas pela empresa fabricante.

Variáveis como tempo de reação, temperatura, pH, e concentração de enzima devem ser estudados antes de iniciar uma hidrólise. Neste estudo a temperatura e concentração de enzima se apresentaram de grande relevância em relação aos resultados obtidos.

Fonkwe e Singh (1996), em experimentos com resíduos de carne de peru mecanicamente desossado, utilizando temperatura de 60,0 °C, e a enzima Papaína 1,7 U/mg em concentração de 2,50 kg/ton, após 2h de reação verificaram uma redução do peso de 51% em relação ao peso inicial, já para este estudo em 2h com a mesma temperatura e concentração de enzima, diferindo a protease utilizada, resultou em valores médio de 80,74%, valores encontrados neste estudo foram relativamente mais elevados em comparação aos relatados por esses autores, que pode ser justificado pelo fato do uso de enzimas e material para hidrólise distintos e aplicação de agitação do material.

TABELA 12. RESPOSTA APRESENTADA PARA MATÉRIA HIDROLISADA (%) DE SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS OBTIDA COM A ENZIMA ALCALASE.

Ensaio	Enzima kg/ton	pH	Temperatura (°C)	Matéria Hidrolisada %						
				1h	2h	6h	12h	24h	48h	Broken- line (h)
1	1,30	6,50	52,5	26,12	30,69	58,05	77,61	87,80	89,74	10,17
2	1,30	6,50	67,5	65,81	77,66	84,04	86,92	88,22	88,88	6,97
3	1,30	8,50	52,5	18,78	24,79	51,60	68,44	85,31	83,83	10,18
4	1,30	8,50	67,5	65,57	77,48	84,55	87,91	89,16	89,90	7,08
5	3,70	6,50	52,5	33,07	40,73	74,55	87,89	92,44	88,97	7,83
6	3,70	6,50	67,5	72,91	82,41	86,98	88,96	89,46	90,06	6,73
7	3,70	8,50	52,5	26,09	35,88	73,17	86,22	90,01	85,14	7,48
8	3,70	8,50	67,5	73,06	82,76	88,08	90,03	90,81	91,35	6,73
9	0,50	7,50	60,0	41,54	65,72	77,84	85,69	89,37	91,24	7,47
10	4,50	7,50	60,0	73,71	83,72	89,72	92,21	93,11	93,97	6,94
11	2,50	5,82	60,0	71,70	81,14	88,44	91,83	93,21	94,05	7,32
12	2,50	9,18	60,0	72,03	82,29	89,44	92,25	93,05	93,28	6,87
13	2,50	7,50	47,4	14,51	22,18	41,25	58,22	76,89	85,19	17,35
14	2,50	7,50	72,6	73,03	79,76	83,86	84,50	85,24	85,78	6,41
15	2,50	7,50	60,0	67,18	80,85	87,65	92,20	94,28	95,05	7,48
16	2,50	7,50	60,0	65,94	78,48	86,11	92,21	93,59	94,22	7,81
17	2,50	7,50	60,0	67,11	79,99	88,26	90,22	90,59	92,89	6,54
18	2,50	7,50	60,0	72,61	81,70	89,41	92,21	92,88	91,51	6,71

FONTE: A autora (2018).

Os diferentes valores de ajustes de pH dentro da faixa avaliada não mostraram efeito significativo sobre a porcentagem de matéria hidrolisada. Divergindo

de outros autores, de acordo com Roslan et al. (2014), os ajustes de pH podem acarretar mudanças que afetam a enzima e o substrato, pois modifica a distribuição de cargas e conformação das proteínas. Conforme Shi et al. (2005), o pH pode ocasionar a dissociação de grupos ativos das enzimas, influenciando na dinâmica e a associação com o substrato.

Conforme os autores Lassé et al. (2015), Valencia et al. (2014), Verhaeghe et al. (2016), o pH é uma variável que deve ser estudada antes de iniciar a hidrólise com diferentes tipos de enzimas e substratos, para se obter resultados satisfatórios, principalmente quando o hidrolisado é utilizado em indústrias alimentícias.

Em estudos realizados por Kurozawa, Park e Hubinger (2008), utilizando carne de frango, constataram que o pH foi uma variável determinante para os resultados alcançados, originando diferenças significativas entre os ensaios. Essa importância em relação ao ajuste de pH pode ser explicada pelo fato do hidrolisado produzido por esses autores ser de uso alimentício, o que acaba tornando uma variável de grande importância, tendo em vista que influencia no sabor dos produtos comestíveis.

Diferenças em relação ao comportamento da hidrólise em relação o pH neste experimento podem ser devido ao não ajuste do pH ao longo da hidrólise, pois o objetivo inicial era analisar o processo de hidrólise sem essa prática, visando desenvolver um processo de menor complexidade.

Baez, Barreneche e Montoya (2016), em estudos de hidrólise aplicando Alcalase 2.4 AU/g em víceras de tilápias vermelha (*Oreochromis spp.*), constataram que as melhores condições foram encontradas nos ensaios em que utilizaram temperatura de 53,0 °C e pH 9,50 resultados diferentes aos encontrados nesta pesquisa que para temperatura os valores que mais se destacaram foram entre 60,0 °C e 67,5 °C, que pode ser explicado pelo tipo de substrato utilizado, tendo em vista que a Alcalase se comporta de forma distinta em substratos diferentes. Esses autores também constataram que a Alcalase apresentou resultados mais eficientes nas variáveis estudadas quando comparada a outras proteases, como a Flavourzyme 500 LAPU/g e a Neutrase 1,5 AU-NH/g.

O ponto ótimo máximo para matéria hidrolisada (%) foi determinado pelo modelo Broken-line, esse modelo auxilia na determinação do tempo em horas em que a reação atinge o ponto máximo e após ocorre um platô, podendo resultar em níveis que promovam a queda ou estabilização no desempenho do processo, o nível ótimo

é determinado pelo ponto de quebra. É uma técnica que permite o pesquisador obter uma compreensão quando ocorreu o ponto ótimo em uma reação.

Os valores encontrados para esse parâmetro podem ser observados na (TABELA 12). Os tempos variaram de 6,41 a 17,35h. O maior tempo (17,35h) foi notado no ensaio em que se empregou a menor temperatura (47,4 °C), seguido dos ensaios em que se utilizou temperatura de 52,5 °C resultando em tempos de 10,17 e 10,18h, evidenciando que temperaturas mais baixas apresentaram valores mais elevados, comparados aos demais ensaios quando se aplicou temperaturas mais altas.

O menor tempo (6,41h) foi verificado no ensaio em que a temperatura testada foi a mais elevada (72,6 °C). Porém, verifica-se que a porcentagem de matéria hidrolisada ao final do processo foi 85,78%, isso pode ter ocorrido por uma melhor condição de atividade enzimática inicial e possível desnaturação da enzima no decorrer do processo devido à alta temperatura, tendo em vista que a temperatura máxima recomendada pelo fabricante da Alcalase é de 70,0 °C. A maioria dos ensaios apresentaram uma média entre 6h a 8h para essa análise, resultados esses encontrados nos ensaios em que se usou temperaturas entre 60,0 °C e 67,5 °C, constatando que para essa variável a temperatura elevada não é adequada. O uso de uma temperatura moderada e não a mais elevada também traz benefícios econômicos quando se considera o custo energético para se manter o sistema aquecido.

De acordo com os resultados obtidos para tempo de reação observou-se que em 6h de processo os resultados de porcentagem de matéria hidrolisada já se mostravam bem satisfatórios para a maioria dos ensaios, exceto quando se utilizou as menores temperatura entre 47,4 °C e 52,5 °C. Verificou-se que após 12h o processo atingiu um platô, não alterando significativamente os resultados após esse período, percebe-se que não haveria a necessidade de longos períodos para que ocorresse uma hidrólise satisfatória. Esse platô pode ser explicado pela escassez de substrato para hidrólise, e a alteração do momento de platô é devido aos fatores estudados que alteram a velocidade da reação de hidrólise.

As equações para o modelo matemático obtidos a partir dos valores de porcentagem de matéria hidrolisada com a utilização da Alcalase são apresentados na (TABELA 13), sendo que o modelo se ajustou aos dados experimentais com valores de coeficientes de variação ( $R^2$ ) acima de 86%. Os efeitos significativos dos fatores lineares e quadráticos também são expostos na (TABELA 13), verificando que



para temperatura quadrática ( $T^2$ ) os resultados foram significativos a 95% de confiança ( $p < 0,05$ ) em todos os horários de coletas.

TABELA 13. EQUAÇÕES DE REGRESSÃO REPRESENTANDO A SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS ENSAIOS PARA MATÉRIA HIDROLISADA (%) DE SUÍNOS MORTOS E NÃO ABATIDOS OBTIDO COM A ENZIMA ALCALASE.

Continua				
Tempo (h)	Equação Y = (% de matéria hidrolisada)	R <sup>2</sup>	Erro	Efeito Significativo*
1	MH=-738,33+24,71*E-4,10*E <sup>2</sup> -4,35*pH 0,740*pH <sup>2</sup> +23,68 *T0,190*T <sup>2</sup> +0,080*E*pH+0,005*E*T+0,237*pH*T	0,939	61,85	E, E <sup>2</sup> , T, T <sup>2</sup>
2	MH=-993,94+27,92*E-3,23*E <sup>2</sup> +18,92*pH- 2,06*pH <sup>2</sup> +29,44 *T-0,230*T <sup>2</sup> +0,165*E*pH-0,154*E*T+0,182*pH*T	0,933	75,17	T, T <sup>2</sup>
6	MH=-627,15+33,05*E-1,44*E <sup>2</sup> -8,25*pH -0,200*pH <sup>2</sup> +21,83 *T-0,170*T <sup>2</sup> +0,590*E*pH-0,439*E*T+0,157*pH*T	0,983	7,473	E, E <sup>2</sup> , T, T <sup>2</sup> , E*T
12	MH=-336,65+19,60*E-0,593*E <sup>2</sup> +19,25*pH +0,251*pH <sup>2</sup> +15,07 *T-0,126*T <sup>2</sup> +0,791*E*pH-0,332*E*T+0,215*pH*T	0,949	9,152	E, T, T <sup>2</sup> , E*T
24	MH=-113,81+7,381*E-0,250*E <sup>2</sup> -12,24*pH +0,313*pH <sup>2</sup> +7,93 *T-0,070*T <sup>2</sup> +0,049*E*pH-0,089*E*T+0,120*pH*T	0,907	3,475	E, T, T <sup>2</sup>
48	MH=-40,00-0,595*E-0,502*E <sup>2</sup> -8,33*pH -0,330*pH <sup>2</sup> +5,44 *T-0,057*T <sup>2</sup> +0,245*E*pH+0,029*E*T+0,200*pH*T	0,863	3,478	T <sup>2</sup>

R<sup>2</sup>= Coeficiente de determinação; \* p value < 0,05, E= Enzima; E<sup>2</sup>= Enzima quadrática; T= Temperatura; T<sup>2</sup>= Temperatura quadrática; E\*T= Interação enzima e temperatura  
FONTE: A autora (2018).

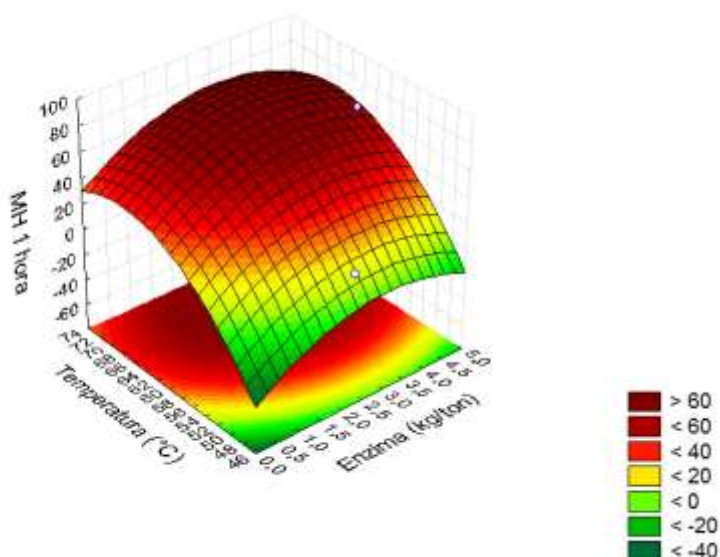
O valor estimado pela equação para a máxima resposta de matéria hidrolisada em 1h foi de 79,74% na condição de temperatura de 67,31 °C e concentração de enzima de 3,12 kg/ton e em 6h foi de 93,31% na condição de 64,11 °C e concentração de enzima de 3,80 kg/ton em 48h o valor para matéria hidrolisada não teve alteração expressiva quando comparada a de 6h de processo, resultando em 93,87% de matéria hidrolisada, em temperatura de 59,16 °C e concentração de 2,66 kg/ton, corroborando com o observado anteriormente sobre a possibilidade de encerramento do processo antes de 48h. Esse fato promove, somado ao demais fatores, também um ganho econômico e uma grande vantagem em termos de tempo necessário para o ciclo completo do processo.

A superfície de resposta gerada pelo modelo para interação temperatura e concentração de enzima das coletas de 1, 2, 6, 12, 24 e 48h para porcentagem de matéria hidrolisada, podem ser visualizadas na (FIGURA 1).

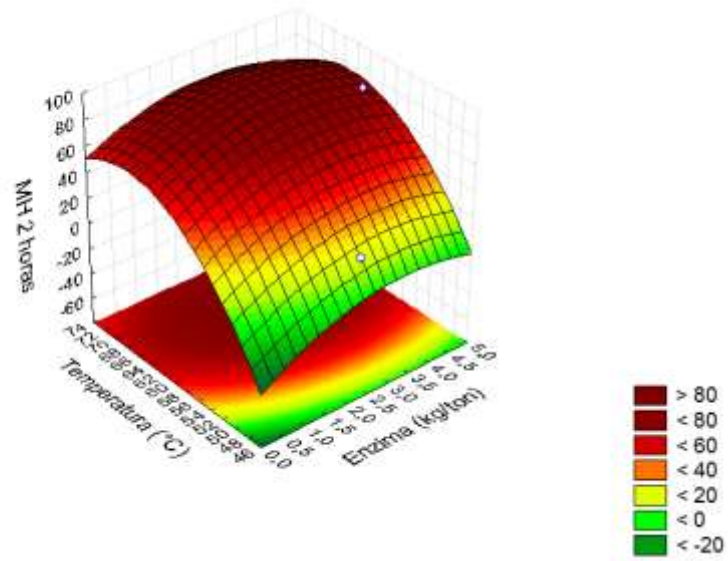
Para temperatura inferior (47,4 °C) e temperatura mais elevada (72,6 °C), houve uma leve estabilização das repostas. Conforme observado após 6h de reação, ocorre uma estabilidade na maioria dos ensaios. Gerou-se também gráficos de superfície de resposta para a interação temperatura e pH, e concentração de enzima e pH, tendo em vista que estes não apresentaram diferenças significativas, conforme podem ser visualizados nos (APÊNDICES 1 e 2).

FIGURA 1: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA A OBTENÇÃO DE MATÉRIA HIDROLISADA UTILIZANDO A ENZIMA ALCALASE: INTERAÇÃO ENTRE (T °C) X (E) EM DIFERENTES HORAS DE COLETA. A) 1H; B) 2H; C) 6H; D) 12H; 24H; E) 48H.

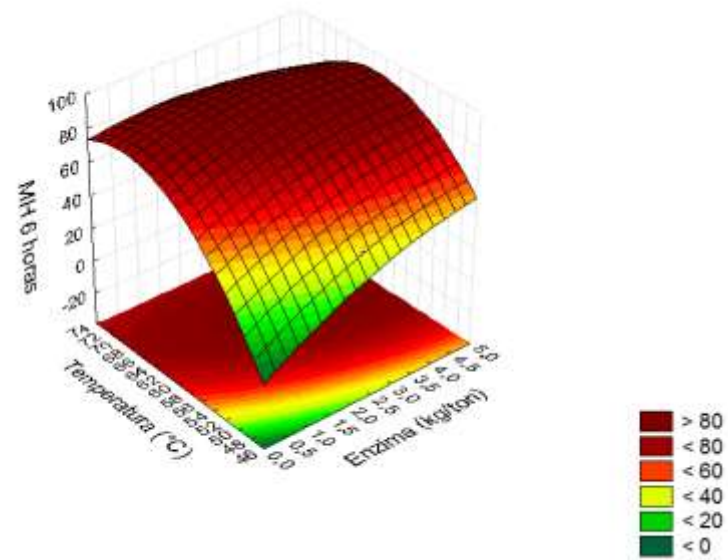
A)



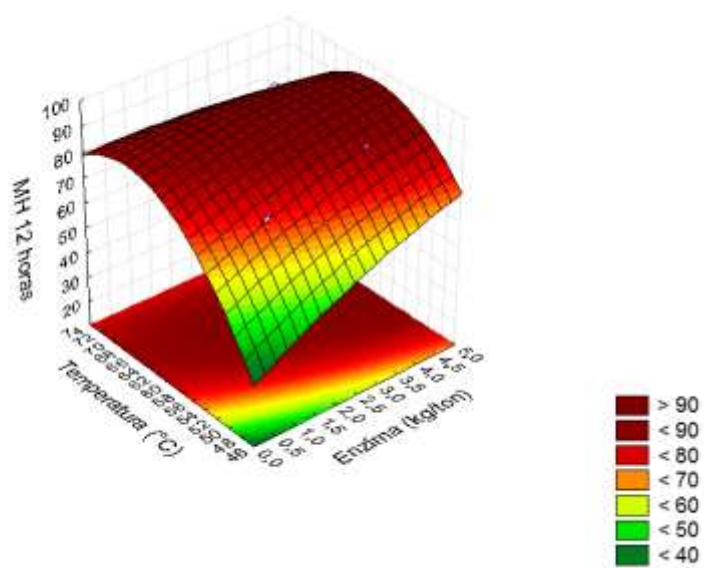
B)



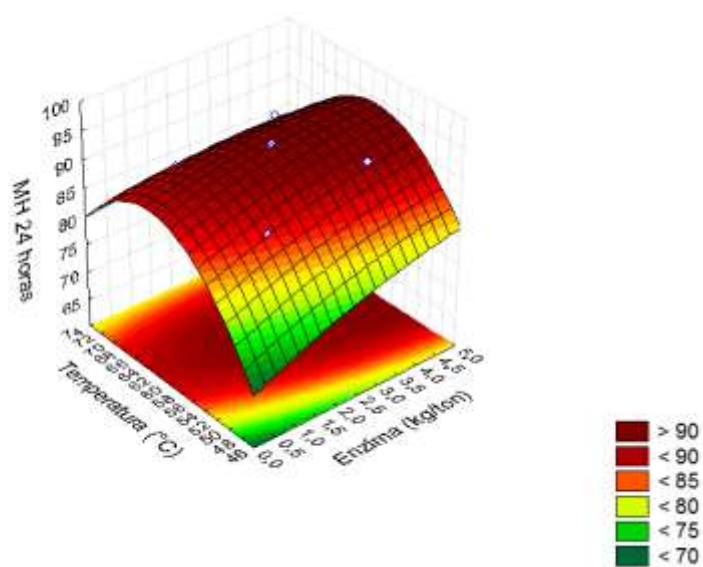
C)



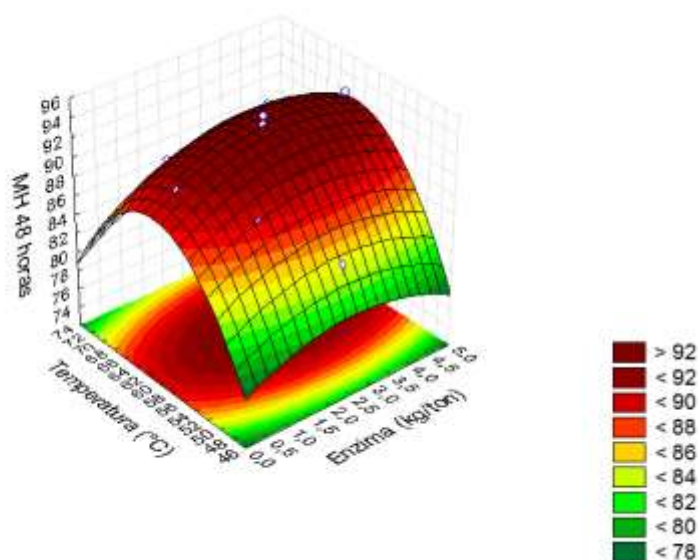
D)



E)



F)



FONTE: A autora (2018).

## 5.2 NITROGÊNIO RECUPERADO

Na (TABELA 14) podem ser observados os valores encontrados para nitrogênio recuperado. Nota-se que os valores para 48h variaram de 78,14% a 92,63%. Os melhores resultados foram identificados nos ensaios em que a temperatura utilizada foi de 60,0 °C e concentração de enzimas de 2,50 kg/ton.

TABELA 14 - VARIÁVEL RESPOSTA NITROGÊNIO RECUPERADO (%) PARA ENSAIOS DE HIDRÓLISE EM SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS UTILIZANDO A ENZIMA ALCALASE.

continua

Ensaio	Concentração de Enzima kg/ton	pH	Temperatura (°C)	Nitrogênio recuperado (%)					
				1h	2h	6h	12h	24h	48h
1	1,30	6,50	52,5	33,16	37,07	58,07	75,53	87,90	91,33
2	1,30	6,50	67,5	59,14	70,11	79,53	83,36	87,21	86,64
3	1,30	8,50	52,5	36,61	41,40	61,08	72,52	86,35	89,03
4	1,30	8,50	67,5	59,79	71,29	82,03	83,30	77,81	78,14
5	3,70	6,50	52,5	39,31	46,99	72,31	86,53	89,91	91,72
6	3,70	6,50	67,5	66,43	78,55	84,86	87,83	90,55	90,71
7	3,70	8,50	52,5	40,75	50,02	70,83	86,08	90,01	90,22
8	3,70	8,50	67,5	67,74	78,93	86,22	86,64	90,16	90,28
9	0,50	7,50	60,0	41,73	61,35	71,98	80,26	88,82	87,50
10	4,50	7,50	60,0	69,24	79,94	84,22	84,07	90,28	92,63
11	2,50	5,82	60,0	66,34	73,71	85,35	86,52	90,85	90,51
12	2,50	9,18	60,0	67,93	79,33	86,82	90,80	92,33	92,04
13	2,50	7,50	47,4	29,62	34,14	47,18	63,96	78,77	85,11
14	2,50	7,50	72,6	67,04	74,60	80,75	81,30	83,32	84,60

TABELA 14 - VARIÁVEL RESPOSTA NITROGÊNIO RECUPERADO (%) PARA ENSAIOS DE HIDRÓLISE EM SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS UTILIZANDO A ENZIMA ALCALASE.

									conclusão
15	2,50	7,50	60,0	62,48	75,74	82,98	88,44	92,53	92,26
16	2,50	7,50	60,0	63,13	74,44	81,99	86,59	89,09	89,92
17	2,50	7,50	60,0	59,74	73,77	80,52	85,74	90,11	90,06
18	2,50	7,50	60,0	69,24	79,83	87,69	91,27	91,81	91,23

FONTE: A autora (2018).

As equações para o modelo matemático obtidos a partir dos valores de nitrogênio recuperado através do uso da Alcalase são apresentados na (TABELA 15), sendo que o modelo se ajustou aos dados experimentais, com valores de coeficientes de variação ( $R^2$ ) acima de 79%. Os efeitos significativos dos fatores lineares e quadráticos e das interações também são expostos na (TABELA 15), verificando que para temperatura quadrática ( $T^2$ ) os resultados foram significativos a 95% de confiança ( $p < 0,05$ ) em todos os horários de coletas.

TABELA 15. EQUAÇÕES DE REGRESSÃO REPRESENTANDO A SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS ENSAIOS PARA NITROGÊNIO RECUPERADO EM SUÍNOS MORTOS E NÃO ABATIDOS UTILIZANDO A ENZIMA ALCALASE.

Tempo (h)	Equação Y = (nitrogênio recuperado (%))	$R^2$	Erro	Efeito Significativo*
1	$NR = -521,18 + 16,32 \cdot E - 2,99 \cdot E^2 + 5,48 \cdot pH - 0,101 \cdot pH^2 + 16,25 \cdot T - 0,120 \cdot T^2 - 0,141 \cdot E \cdot pH + 0,069 \cdot E \cdot T - 0,249 \cdot pH \cdot T$	0,923	32,934	E, $E^2$ , T, $T^2$
2	$NR = -792,95 + 20,04 \cdot E - 2,46 \cdot E^2 + 28,48 \cdot pH - 1,39 \cdot pH^2 + 22,38 \cdot T - 0,164 \cdot T^2 - 0,218 \cdot E \cdot pH - 0,034 \cdot E \cdot T - 0,097 \cdot pH \cdot T$	0,946	29,328	T, $T^2$
6	$NR = -450,65 + 27,21 \cdot E - 1,49 \cdot E^2 - 11,20 \cdot pH - 0,727 \cdot pH^2 + 16,61 \cdot T - 0,126 \cdot T^2 - 0,587 \cdot E \cdot pH - 0,201 \cdot E \cdot T + 0,039 \cdot pH \cdot T$	0,981	5,077	E, $E^2$ , T, $T^2$
12	$NR = -253,60 + 20,94 \cdot E - 1,14 \cdot E^2 - 12,53 \cdot pH + 0,67 \cdot pH^2 + 11,47 \cdot T - 0,089 \cdot T^2 + 0,149 \cdot E \cdot pH - 0,233 \cdot E \cdot T + 0,037 \cdot pH \cdot T$	0,880	11,805	E, T, $T^2$
24	$NR = -130,81 - 13,79 \cdot E - 0,284 \cdot E^2 + 0,138 \cdot pH + 0,319 \cdot pH^2 + 7,98 \cdot T - 0,061 \cdot T^2 + 1,110 \cdot E \cdot pH + 0,139 \cdot E \cdot T - 0,139 \cdot pH \cdot T$	0,799	7,669	E, $T^2$
48	$NR = -19,82 - 1643 \cdot E - 0,214 \cdot E^2 + 0,177 \cdot pH - 0,127 \cdot pH^2 + 4,55 \cdot T - 0,038 \cdot T^2 + 0,923 \cdot E \cdot pH + 0,203 \cdot E \cdot T - 0,085 \cdot pH \cdot T$	0,829	4,722	E, $T^2$ , $E \cdot T$

$R^2$ = Coeficiente de determinação; \* p value < 0,05, E= Enzima;  $E^2$ = Enzima quadrática; T= Temperatura;  $T^2$ = Temperatura quadrática;  $E \cdot T$ = Interação enzima e temperatura

FONTE: A autora (2018).

Santos et al. (2009), em pesquisa com Cabrinha (*Prionotus punctatus*) utilizando a Alcalase 2.4 AU/g encontraram valores para nitrogênio recuperado entre

76,1% a 86,1% quando utilizaram temperatura de 60,0 °C em 1h de hidrólise. Quando avaliaram temperatura de 70,0 °C, encontraram valores para recuperação de nitrogênio de 88,5%, diferindo desta pesquisa, que em temperatura mais elevada ocorreu um leve declínio em comparação as demais temperaturas. O que demonstra que a temperatura é um parâmetro relevante para nitrogênio recuperado e varia de acordo com o tipo de substrato utilizado.

Conforme Liaset, et al. (2002), em estudos com salmão (*Salmo Salar*, L) utilizando a enzima Protemax 1,5 AU-NH/g em 2h de reação com temperaturas de 36,0 °C a 50,0 °C encontram valores para nitrogênio recuperado entre 44% a 76%.

### 5.3 GRAU DE HIDRÓLISE

Por meio dos valores de grau de hidrólise é possível estimar a extensão da proteína clivada, influenciando nas propriedades funcionais do hidrolisado (LICEAGA; LI-CHAN, 1999). Pelo rendimento do grau de hidrólise é possível determinar o caráter funcional e biológico do hidrolisado obtido.

De acordo com Fonkwe e Singh (1996) os valores para grau de hidrólise obtidos no hidrolisado, podem ser utilizados para determinar o comprimento médio da cadeia de suas proteínas (peptídeos e aminoácidos).

Os valores para grau de hidrólise em 48h podem ser observados na (TABELA 15). Os resultados variaram de 69,89% a 88,33%. A maior porcentagem obtida (88,33%), foi identificada no ensaio em que se aplicou concentração de enzima de 2,50 kg/ton e temperatura de 60,0 °C. Já o menor valor verificado foi de 69,89% no ensaio em que se aplicou concentração de enzima 1,30 kg/ton e temperatura de 67,5 °C. Ensaios em que temperatura testada foi elevada 72,6 °C, notou-se que o valor de grau de hidrólise foi o menor para 48h.

TABELA 16. RESPOSTA APRESENTADA PARA GRAU DE HIDRÓLISE (%) DE SUÍNOS MORTOS E NÃO ABATIDOS OBTIDO COM A ENZIMA ALCALASE.

continua

Ensaios	Enzima (kg/ton)	pH	Temperatura (°C)	Grau de hidrólise (%)					
				1h	2h	6h	12h	24h	48h
1	1,30	6,50	52,5	24,47	30,55	49,71	64,81	76,40	79,99
2	1,30	6,50	67,5	44,94	54,65	64,68	66,91	69,46	71,75
3	1,30	8,50	52,5	30,16	35,24	53,77	64,24	79,07	79,57
4	1,30	8,50	67,5	50,47	61,76	71,73	76,00	68,03	69,89

TABELA 16. RESPOSTA APRESENTADA PARA GRAU DE HIDRÓLISE (%) DE SUÍNOS MORTOS E NÃO ABATIDOS OBTIDO COM A ENZIMA ALCALASE.

									conclusão
5	3,70	6,50	52,5	32,93	40,16	61,52	74,94	82,98	83,65
6	3,70	6,50	67,5	53,75	68,04	74,86	77,50	80,80	80,38
7	3,70	8,50	52,5	36,04	44,32	67,90	80,25	85,47	82,35
8	3,70	8,50	67,5	58,59	70,96	75,78	78,48	80,39	82,50
9	0,50	7,50	60,0	30,95	43,90	63,07	69,77	73,31	78,36
10	4,50	7,50	60,0	59,12	70,60	85,21	84,75	83,16	87,84
11	2,50	5,82	60,0	52,90	57,63	68,91	76,02	87,83	81,10
12	2,50	9,18	60,0	59,39	65,83	75,84	80,35	84,99	78,08
13	2,50	7,50	47,4	27,30	29,61	46,80	63,09	78,25	85,05
14	2,50	7,50	72,6	52,93	60,83	64,32	66,57	68,08	71,48
15	2,50	7,50	60,0	52,30	64,60	76,20	83,12	84,55	88,33
16	2,50	7,50	60,0	52,12	61,54	78,28	83,89	81,61	85,01
17	2,50	7,50	60,0	50,20	61,63	77,20	83,26	80,93	86,55
18	2,50	7,50	60,0	55,70	66,32	75,76	82,88	86,29	80,52

FONTE: A autora (2018).

As equações para o modelo matemático obtidos a partir dos valores de grau de hidrólise através do uso da Alcalase são apresentados na (TABELA 17), sendo que o modelo se ajustou aos dados experimentais, com valores de coeficientes de variação ( $R^2$ ) acima de 89%. Os efeitos significativos dos fatores lineares e quadráticos também são expostos na (TABELA 17), verificando que para concentração de enzima (E) os resultados foram significativos a 95% de confiança ( $p < 0,05$ ) em todos os horários de coletas, na forma quadrática também, exceto pelo tempo de 48h.

TABELA 17. EQUAÇÕES DE REGRESSÃO REPRESENTANDO A SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS EXPERIMENTOS PARA GRAU DE HIDRÓLISE (%) DE SUÍNOS MORTOS E NÃO ABATIDOS OBTIDO COM A ENZIMA ALCALASE.

Tempo (h)	Equação Y = (Grau de hidrólise (%))	$R^2$	Erro	Efeito Significativo*
1	$GH = -225,26 + 16,76 \cdot E - 2,44 \cdot E^2 - 22,85 \cdot pH + 1,62 \cdot pH^2 + 9,61 \cdot T - 0,072 \cdot T^2 - 0,341 \cdot E \cdot pH + 0,036 \cdot E \cdot T + 0,026 \cdot pH \cdot T$	0,915	23,24	E, $E^2$ , T, $T^2$
2	$GH = -531,079 + 16,30 \cdot E - 2,17 \cdot E^2 + 13,72 \cdot pH - 0,753 \cdot pH^2 + 15,34 \cdot T - 0,117 \cdot T^2 - 0,491 \cdot E \cdot pH + 0,054 \cdot E \cdot T + 0,020 \cdot pH \cdot T$	0,962	14,656	E, $E^2$ , pH
6	$GH = -571,73 + 23,86 \cdot E - 1,32 \cdot E^2 + 21,92 \cdot pH - 1,083 \cdot pH^2 + 16,55 \cdot T - 0,125 \cdot T^2 - 0,397 \cdot E \cdot pH - 0,163 \cdot E \cdot T - 0,041 \cdot pH \cdot T$	0,986	2,896	E, $E^2$ , pH, T, $T^2$ , $E \cdot T$



TABELA 17. EQUAÇÕES DE REGRESSÃO REPRESENTANDO A SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS EXPERIMENTOS PARA GRAU DE HIDRÓLISE (%) DE SUÍNOS MORTOS E NÃO ABATIDOS OBTIDO COM A ENZIMA ALCALASE.

				conclusão
12	$GH = -468,56 + 24,04 * E - 1,487 * E^2 + 23,57 * pH - 1,780 * pH^2 + 13,88 * T - 0,116 * T^2 - 0,233 * E * pH - 0,182 * E * T + 0,089 * pH * T$	0,970	3,595	E, $E^2$ , pH, $pH^2$ , T, $T^2$ , E*T
24	$GH = -136,86 + 0,97 * E - 1,46 * E^2 + 5,83 * pH + 0,83 * pH^2 + 8,32 * T - 0,069 * T^2 + 0,089 * E * pH + 0,149 * E * T - 0,117 * pH * T$	0,943	4,681	E, $E^2$ , T, $T^2$ ,
48	$GH = -142,08 - 8,60 * E - 0,69 * E^2 + 30,08 * pH - 2,22 * pH^2 + 4,55 * T - 0,048 * T^2 + 0,322 * E * pH + 0,206 * E * T + 0,033 * pH * T$	0,896	6,367	E, $pH^2$ , T, $T^2$ ,

R<sup>2</sup>= Coeficiente de determinação; \* p value < 0,05, E= Enzima; E<sup>2</sup>= Enzima quadrática; T= Temperatura; T<sup>2</sup>= Temperatura quadrática; E\*T= Interação enzima e temperatura  
 FONTE: A autora (2018).

Nota-se que a alta temperatura pode ter ocasionado uma redução do porcentual de proteína clivada em peptídeos e aminoácidos, sendo um indício de desnaturação enzimática. Verifica-se que os valores até 6h já eram considerados satisfatórios na maioria dos ensaios, pouco alterando após esse período. Também é possível verificar uma proximidade dos valores de nitrogênio recuperado com o grau de hidrólise, constatando que houve uma eficiente clivagem das proteínas em peptídeos e aminoácidos.

Temperaturas mais elevadas ocasionaram uma redução no grau de hidrólise, e isso pode ser explicado teoricamente, com o aumento da temperatura ocorre também um aumento na energia cinética das moléculas, sua estrutura terciária é comprometida quando em condições de temperaturas mais elevadas, acarretando a redução da atividade catalítica (PÉREZ-GÁLVEZ et al. 2011). Mackie (1982), constatou que posteriormente a uma fase inicial rápida, a taxa de hidrólise tende a diminuir, ocasionando uma fase estacionária.

Kurozawa, Park e Hubinger (2008), em estudos de hidrólise enzimática utilizando carne de frango e a enzima Alcalase 2.4 AU/g encontraram os melhores resultados para grau de hidrólise nos ensaios em que usaram temperatura de 60,0 °C, concentração de enzima de 2,5 kg/ton e pH 7,16 o que corrobora com os dados encontrados nesta pesquisa. Esses autores verificaram também que nos ensaios em que utilizaram a temperatura para 70,0 °C houve um leve declínio nos resultados, constatando que temperaturas mais altas podem levar a desnaturação das enzimas ao longo da hidrólise, afetando sua atividade. Verificaram também que temperaturas

inferiores a 50,0 °C ocasionaram uma redução nas respostas. Ambos resultados corroboram com os encontrados nesta pesquisa.

Chalamaiah et al. (2009), em experimentos enzimáticos com ovo de peixe Meriga (*Cirrhinus mrigala*), utilizando a enzima Alcalase 2.4 AU/g após 90 minutos de reação manuseando temperaturas de 50,0 °C a 55,0 °C, detectaram valores para grau de hidrólise de 62%. Neste estudo utilizando temperatura de 47,4 °C em 2h os valores foram de 29,61%.

Charoenphun et al. (2012), em estudos com tilápia (*Oreochromis niloticus*), avaliando o processo de hidrólise a uma temperatura de 50,0 °C em 6h de hidrólise, utilizando uma mistura das enzimas Alcalase 2.4 AU/g e Papaína Látex-1,5 U/mg, encontraram valores de grau de hidrólise de 52,1%, e quando utilizaram somente a Alcalase os resultados foram de 47,8%, e quando usaram somente a Papaína obtiveram 41,6%. Neste estudo em 6h de hidrólise em temperatura de 47,4 °C o resultado foi de 46,80%.

Baez, Barreneche e Montoya (2016), em pesquisas com víceras de tilápias vermelha (*Oreochromis spp.*), com aplicação da enzima Alcalase 2.4 AU/g, em temperatura de 65,0 °C, em reações que duraram 6h encontraram valores para grau de hidrólise próximos a 11,5%, resultados relativamente mais baixos aos encontrados neste estudo. Neste mesmo experimento os autores testaram as enzimas Flavourzyme 500 LAPU/g e a Neutrase 1,5 AU-NH/g, em todas as combinações de temperatura e pH testados, a Alcalase se apresentou mais eficiente para grau de hidrólise em comparação a essas enzimas. Isso pode ser explicado pelo fato da Alcalase apresentar maior atividade em comparação a enzimas alcalinas como a Flavourzyme e a Neutrase (DUMAY et al., 2006; KLOMPONG et al., 2007).

Fonkwe e Singh (1996), em estudos com resíduos de carne de peru mecanicamente desossados utilizando a enzima Papaína-Látex 1,5 AU/g, a uma temperatura de 60,0 °C encontraram após 2h de processo valores para grau de hidrólise entre 65% e 70%.

Nos experimentos realizados por Martins, Costa e Prentice-Hernández (2009), com corvina (*Micropogonias furnieri*), encontraram valores para grau de hidrólise em torno de 56% quando usaram somente o filé, e 37% quando utilizaram o resíduo desse pescado, por meio do uso de Alcalase 2.4 AU/g em uma temperatura de 60,0 °C, em 1h de hidrólise.

Santos et al. (2008), em testes com pescado de cabrinha (*Prionotus punctatus*), utilizando Alcalase 2.4 AU/g encontraram o maior grau de hidrólise 34,7%, em temperatura de 70,0 °C, e o menor resultado 18,6% quando trabalharam com temperatura de 60,0 °C.

Oliveira et al. (2014), em avaliações com carne de frango mecanicamente separada utilizando as enzimas Papaína Látex-1,5 U/mg, Flavourzyme 1,0 LAPU/g e Protamax 1,5 AU-NH/g, encontraram valores de grau de hidrólise de 66%, 29% e 61% respectivamente, após 2h de hidrólise.

Herpandi et al. (2012), em estudos utilizando diferentes tipos de enzimas proteolíticas Flavourzyme, Protamex, Neutrase e Alcalase, em hidrólise de atum (*Thunnus spp.*) verificaram que o maior grau de hidrólise foi obtido em ensaios que utilizaram a Alcalase.

As diferenças nos valores encontrados na literatura quando comparados aos detectados neste estudo pode ser explicado pelas distintas frações proteicas encontrados nos diferentes materiais utilizados na hidrólise.

#### 5.4 MATÉRIA SECA E CINZAS DO RESÍDUO FINAL E PROTEÍNA BRUTA FINAL

Os valores de matéria seca e cinzas do resíduo final e proteína bruta final podem ser observados na (TABELA 18). Os resultados para matéria seca variaram entre 16,82% a 54,01%, para cinzas esses valores foram de 7,19% a 24,67% no resíduo e 4,69% a 5,22% para proteína bruta no hidrolisado líquido final após 48h de reação.

O menor percentual de matéria seca (16,82%), cinzas (7,19%) e proteína bruta final (4,69%), foi observado no mesmo ensaio (ensaio 14), em que se utilizou concentração de enzima de 2,50 kg/ton e a temperatura mais elevada 72,6 °C. O ensaio em que se utilizou a maior concentração de enzima 4,50 kg/ton expressou o maior valor de matéria seca 54,01% e 21,5% de cinzas e 5,02 % de proteína bruta.

TABELA 18 - VALORES PARA MATÉRIA SECA (%) E CINZAS DO RESÍDUO E PROTEÍNA BRUTA DO HIDROLISADO COM 48H DE HIDRÓLISE DE SUÍNOS MORTOS NÃO ABATIDOS EM FUNÇÃO DO PH INICIAL, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA KG/TON E TEMPERATURA (°C).

Ensaio	Enzima kg/ton	pH	Temperatura (°C)	MS (%) Resíduo	CZ (%) Resíduo	PB (%) Hidrol. LÍq.
1	1,30	6,50	52,5	39,16	18,26	5,22
2	1,30	6,50	67,5	35,33	12,51	4,80
3	1,30	8,50	52,5	44,35	10,18	5,14
4	1,30	8,50	67,5	37,20	15,44	4,79
5	3,70	6,50	52,5	53,74	12,98	5,08
6	3,70	6,50	67,5	50,19	16,21	4,87
7	3,70	8,50	52,5	49,37	11,40	5,03
8	3,70	8,50	67,5	46,32	17,42	4,78
9	0,50	7,50	60,0	35,46	14,11	4,84
10	4,50	7,50	60,0	54,01	21,50	5,02
11	2,50	5,82	60,0	43,32	20,76	4,81
12	2,50	9,18	60,0	52,07	18,49	4,94
13	2,50	7,50	47,4	47,60	22,85	4,94
14	2,50	7,50	72,6	16,82	7,19	4,69
15	2,50	7,50	60,0	48,81	24,67	4,91
16	2,50	7,50	60,0	51,56	20,82	4,92
17	2,50	7,50	60,0	51,10	24,06	4,73
18	2,50	7,50	60,0	37,39	16,74	4,93

Matéria seca (MS), Cinzas (CZ), Proteína bruta PB

FONTE: A autora (2018).

De acordo com os resultados obtidos percebe-se que o menor valor de matéria seca foi obtido quando a hidrólise ocorreu em temperatura mais elevada (72,6 °C). Este fato pode ser explicado pelo fato de proteínas desnaturadas apresentarem maior capacidade de absorver água, pois a alta hidrofobicidade da proteína desnaturada faz com que ocorra a formação de uma matriz proteica com a capacidade de reter uma certa quantidade de água em sua estrutura.

Em experimentos com carne mecanicamente separada de frango, Oliveira, Franzen e Terra (2014), utilizando a enzima Papaína Látex-1,5 units/mg em temperatura de 60,0 °C, Flavourzyme 1000 LAPU/g em 50,0 °C, e Protemax 1,5 AU-NH/g temperatura de 50,0 °C, em 2h de reação encontraram valores de matéria seca de 5,08%, 12,20% e 10,38%, respectivamente.

Os valores encontrados para matéria seca e cinzas, foram relativamente maiores em comparação aos encontrados na literatura, essa diferença pode ser explicada pelo tipo material utilizado neste estudo, devido a presença de fragmentos ósseos, pelo e pele, que não é possível a degradação pela protease Alcalase.

Nos testes de hidrólise com corvina (*Micropogonias furnieri*), Martins, Costa e Prentice-Hernández (2009), usando Alcalase 2.4 AU/g a uma temperatura de 60,0 °C

e concentração de enzima de 0,5% encontraram valores de porcentagem de cinzas de 12,98%.

Em pesquisas utilizando pescados de água salgada, Maria luíza (*Paralichthys brasiliensis*), perna-de-Moça (*Cynoscion* sp) e camarão-rosa (*Penaeus pauliensis*), sem exoesqueleto, pele e vísceras, utilizando as proteases como a pepsina, quimotripsina e bromelina, e temperaturas de 37,0 °C e 45,0 °C, os autores Neves, Mira e Marquez (2004), encontraram valores de porcentagem de cinzas de 10,7% a 18,7%, em reações que duraram 5h.

Em estudos realizados com carcaças de frango manualmente desossadas, Oliveira et al. (2015), em hidrólise com duração de 2h, utilizando as enzimas Flavourzyme 1,0 LAPU/g e Protamax 1,5 AU-NH/g em temperatura de 50,0 °C encontraram valores de cinzas 12,86% e 11,07% respectivamente.

Raftani et al. (2016) em experimentos utilizando músculo de choco (*Sepia pharaonis*), aplicando Alcalase 2.4 AU/g, em 2h de hidrólise e temperatura de 55,0 °C encontraram valores de cinzas de 1,25%, resultado esse relativamente bem menor que aos detectados neste estudo, essa diferença pode ser explicada pelo tipo de material utilizado por esses autores, tendo em vista que o músculo desse molusco marinho foi triturado antes de iniciar o processo, sendo mais fácil a degradação do material.

Em testes com resíduos de carne de peru mecanicamente desossada Fonkwe e Singh (1996), utilizando Papaína com atividade de 1,7 U/mg em temperatura de 60,0 °C encontraram valores de cinzas de 15% após 2h de hidrólise.

## 6 PERSPECTIVA DE USO DO HIDROLISADO PROVENIENTE DA HIDRÓLISE

Os hidrolisados proteicos têm sido amplamente utilizados em diversos setores, como na área médica, na preparação de dietas especiais para a alimentação de bebês, em pacientes que não conseguem digerir proteína e, principalmente, em produtos alimentícios pelo fato de apresentarem propriedades funcionais de grande interesse.

Devido ao foco do presente estudo, a utilização do hidrolisado para esses fins está totalmente descartada, pelo fato da natureza do material utilizado, suínos mortos e não abatidos. Mas como o hidrolisado de suínos mortos apresenta elevado valor proteico, estudos devem ser realizados para a aplicação deste material obtido por meio da hidrólise.

Segundo Chalamaiah et al. (2009) o hidrolisado pode possuir peptídeos bioativos, proteínas de alta solubilidade e baixa viscosidade mesmo em altas concentrações o que torna o hidrolisado proteico interessante para outros fins. Uma das alternativas de uso deste produto é como biofertilizante, visando um melhor desempenho das plantas e uma redução de custos com fertilizantes químicos minerais ou sintéticos, gerando assim menor impacto ambiental acarretado pelo uso excessivo de fertilizantes industriais, melhorando também a qualidade do solo.

Castro (2011), em experimentos utilizando hidrolisados obtidos por meio de couro, removendo cromo presente no material, destinou o hidrolisado como fertilizante em plantação de eucalipto e constatou que o uso do hidrolisado se apresentou como boa fonte de nitrogênio para a cultura, e quando associado com fertilizante mineral proporcionou aumento na altura das plantas. Identificou também que o colágeno presente no material garantiu uma elevada capacidade de retenção de água que auxiliou no condicionamento do solo.

Outra alternativa que pode se apresentar interessante para a aproveitamento do hidrolisado líquido e da matéria não hidrolisada sólida resultantes do processo de hidrólise de suínos mortos não abatidos é a utilização em biodigestores para a produção de biogás. Biogás é uma mistura de combustível obtidas pelo processo de digestão anaeróbia, em que a matéria orgânica é modificada e transformada em produto líquido ou gasoso (WEILAND; VERSTRAETE; VAN HAANDEL, 2009). Ribeiro (2016), em estudos do uso de hidrolisado oriundos de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de biogás, concluiu que a degradação do hidrolisado e a

geração de biogás apresentou resultados promissores através do uso desse hidrolisado.

O uso do hidrolisado proteico obtido no processo de hidrólise enzimática também pode vir a ser estudado como um possível produto com valor agregado a ser adicionado em dietas de animais, mas claro que para isso anteriormente devem ser realizados os mais diversos estudos e análises laboratoriais para a identificação risco sanitário presente neste material. Decarli et al. (2016), em estudos realizados com diferentes hidrolisados cárneos na alimentação de jundiá (*Rhamdia quelen*), notaram que os peixes que foram alimentados com hidrolisados obtiveram resultados satisfatórios em relação a ganho de peso.

De modo geral estudos ainda devem ser realizados para o conhecimento da melhor técnica a ser aplicada para a destinação desses resíduos provenientes da hidrólise enzimática de suínos mortos não abatidos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos em escala laboratorial, a degradação de suínos mortos não abatidos sem a adição de enzima demonstrou ser interessante dependendo do propósito do processo. Os ensaios utilizando a enzima Alcalase com o objetivo de acelerar a hidrólise dos animais mortos, apresentaram respostas relevantes em relação as variáveis testadas, principalmente para matéria hidrolisada, parâmetro importante para este estudo. Fica evidente na análise para grau de hidrólise que a utilização de enzimas proporcionou uma maior extensão da proteína clivada.

No experimento sem adição de enzimas para a maioria das variáveis estudadas as temperaturas que se destacaram foram entre 52,5 °C e 60,0 °C, porém, temperaturas próximas ao 52,5 °C apresentam a questão de início de processo de putrefação após 12h em ambos experimentos.

Nos ensaios em que se utilizou enzimas, as concentrações que mais se destacaram foram de 2,50 kg/ton e 3,70 kg/ton quando manipuladas temperaturas de 60,0 °C e 67,5 °C. Os resultados se apresentaram eficientes para a maioria dos parâmetros avaliados em 6h de hidrólise, verificando que não haveria a necessidade da condução da hidrólise até as 48h. O uso de enzimas proteolíticas é uma alternativa para a degradação de proteína animal e apresentou resultados mais satisfatórios em relação a não utilização de enzimas.

Por meio deste trabalho foi possível maximizar as condições operacionais para a hidrólise, constatando que nos ensaios em que se utilizou enzimas a porcentagem de matéria hidrolisada se apresentou maior e o tempo de degradação menor.

Estudos ainda devem ser realizados para a verificação da viabilidade da hidrólise enzimática de suínos mortos não abatidos em reatores de larga escala, investigando a presença de patógenos e a possibilidade de aplicação do hidrolisado obtido por meio desta técnica em outras atividades como uma alternativa de destinação do hidrolisado.



## REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishers. p. 110-169, 1986.
- BAEZ, A.J.; OSPINA, N. Y.; ZAPATA, J.E. Efecto de Temperatura, pH, Concentración de Sustrato y Tipo de Enzima en la Hidrólisis Enzimática de Vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis Spp.*), **Información Tecnológica**, Medellín, v. 27, n. 6, p. 63-76, 2016.
- BAILEY, J. M.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Mc GrawHill Intl Editions, p. 928, 1986.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: UNICAMP. p. 401. 2002.
- BAS, D.; BOYACI, I. Modeling and optimization: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, Westport, v. 78, p.836-845, 2007.
- BATISTA I. Hidrolisados proteicos de pescado. Tecnologia do Pescado. **Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**, p. 386-398, 2011.
- BRAGA, F.; LIMA, F.; MAIA, G.; RASI, L.; ONDER, L.O.D. **Estudo de viabilidade técnica e econômica destinado a implantação do parque produtivo nacional de aditivos da indústria de alimentação de animais de produção**. Passo Fundo, Editora Méritos. p. 300, 2012.
- BENÍTEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquím. Clín. Latinoam**. Argentina, v. 42, n. 2, p. 227-36, 2008.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- BIASUTTI, E. A. Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina. **Dissertação de Mestrado em Farmácia**. Faculdade de Farmácia da UFMG, p. 88, 2006.
- BHASKAR, N.; MODI, V.K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource technology**, Barking, v. 98, n. 2, p. 388-394, 2007.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, H.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments**. New York: John Wiley Co. 1978. p. 306-351, 501-539.

CASTRO, I. A. Resíduo de Couro “Wet-blue” Após a Extração do Cromo: Uso como Fertilizante Nitrogenado em Plantação de Eucalipto. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CHALAMAIAH, M.; RAO, G.N.; RAO, D.G.; JYOTHIRMAYI, T. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. **Food Chemistry**, Habshiguda, v. 120, p.652-657, 2009.

CHAROENPHUN, N.; CHEIRSILP, B.; SIRINUPONG, N.; YOURAVONG, W. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 236, n. 1, p. 57-63, 2012.

CHERUBINI, E.; ZANGHELINI, M.; ALVARENGA, R.A.F.; FRANCO, D.; SOARES, S.R. Life cycle assessment of swine production in Brazil: a comparison of four manure management systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 87, p. 68-77, 2015.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hidrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, n.n7, p. 254-262, 2000.

COLOMBIÉ, S.; GAUNAND, A.; LINDET, B. Lysozyme inactivation under mechanical stirring: Effect of physical and molecular interfaces. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 820-826, 2001.

DE AGUIAR, C. M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando células produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. 2010. 118 p. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química** – Centro de Engenharias e Ciências Exatas, UNIOESTE, Toledo, 2010.

DECARLI, A.J; PEDRON, A.F; LAZZARI, R; SIGNOR, A. BOSCOLO, R.W. FEIDEN A. Hidrolisados proteicos na alimentação do jundiá (*Rhamdia voulezi*) Protein hydrolysates in feeding of catfish (*Rhamdia voulezi*). **Revista Brasileira de Ciência Animal**, v. 23, p. 168-173, 2016.

DEESLIE, W.D, CHERYAN, M. Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. **Journal Food. Science**, v. 46, p. 1035-1046, 1981.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. **Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 48, n. 3, p. 191-200, 1997.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein. **Food Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 91-98, 1998.

DUAN, H.H.; WANG, J.L.; YI, M.H.; YIN, A.Q. Recovery of proteins from silver carp by products with enzymatic hydrolysis and reduction of bitterness in hydrolysate. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, p. 962-978, 2010.

---

DUMAY, J.; DONNAY, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P. Y.; BERGÉ J.P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochem**, v. 41, p. 2327-2332, 2006.

ELAVARASAN, K.; NAVEEN, K.V.; SHAMASUNDAR, B.A. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla catla*) as influenced by nature enzyme. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, p. 1207-1214, 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias para destinação de animais mortos - TEC-DAM**. Concórdia: Embrapa, 2016. 13 p. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/documents/1355242/14254919/Nota+Técnica+-+2º Workshop+TEC-DAM.pdf](https://www.embrapa.br/documents/1355242/14254919/Nota+Técnica+-+2º+Workshop+TEC-DAM.pdf)>. Acesso em: 05 Jan. 2018.

EREN, I.; KAYAMAK-ERTEKIN, F. Optimization of osmotic dehydration of potato using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, Westport, v. 79, p. 344-352, 2007.

ESLAHI, N.; DADASHIAN F.; NEJAD Y. N. H. Optimization of enzymatic hydrolysis of wool fibers for nanoparticles production using response surface methodology, **Biochemical Biotechnology**, v. 24, p. 416-26, 2013.

FIGUEROA O. A.; J. E. ZAPATA Y G.; A. GUTIÉRREZ, Modeling of the kinetics of enzymatic hydrolysis of bovine plasma proteins. **Revista EIA**, v. 17, p. 71-84, 2012.

FRAATZ, M. A.; RÜHL, M.; ZORN, H. Food and feed enzymes. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 143, p. 229-256, 2014

FREUND, R. J.; LITTELL, R. C. SAS® System for **Regression**. 4. ed. Cary, NC. SAS Institute Inc, p. 235, 2000.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**. v. 31, p. 605-616, 1996.

GAMA, M., AIRES-BARROS, M. R., CABRAL, J.; **Engenharia Enzimática**, Lidel: Portugal, p. 272, 2003.

GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y. Functional and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 78-87, 2003.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technonology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 50-60.1994.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Ateneu, p. 608. 2011.

GONZÁLEZ-TELLO, P. et al. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic Models. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 4, p. 523-528, 1994.

GUO, Y.; PAN, D.; TANOKURA, M. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from 47 whey protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 114, p. 328-333, 2009.

HERPANDI; HUDA, N.; ROSMA, A.; WAN NADIAH W. A. Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases International. **Food Research Journal**, v. 19, p. 863-867, 2012.

HSU, K. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. **Food Chemistry**, v. 122, p. 42-48, 2010.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-epecuaria/9203-pesquisas-trimestrais-do-abate-de-animais.html?edicao=18777&t=destaques>>. Acesso em: 04 Jan. 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed. São Paulo: IMESP, v. 3, p. 27-28, 1985.

JEMLI, S.; AYADI-ZOUARI, D.; HLIMA, H. B.; BEJAR, S. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. **Revista Biotechnology**, v. 36, p. 246-258, 2016.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D. Y.; SHAHIDI, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1317-1327, 2007.

KRABBE, E. L.; SANTOS, I.F.; MIELE, M.; MARTINS, F.M. **Cadeias produtivas de suínos e aves**. 2013. Disponível em: <[http://www.ifsul.edu.br/index.php?option=com\\_docman&Itemid=180](http://www.ifsul.edu.br/index.php?option=com_docman&Itemid=180)>. Acesso em: 05 jan. 2018.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B.A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. University of Massachusetts at Amherst, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influência das condições de processo na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 557-566, 2009.

LAMNATOU, C.; EZCURRA-CIAURRIZ, X.; CHEMISANA, D.; PLA-ARAGON, L.M. Environmental assessment of a pork-production system in Northeast of Spain

focusing on life-cycle swine nutrition. **Journal of Cleaner Production**, v. 137, p. 105-115, 2016.

LASSÉ, M. S.; DEB-CHOUDHURY, S.; HAINES, N.; LARSEN, J. A.; GERRARD, J. M. D. The impact of pH, salt concentration and heat on digestibility and amino acid modification in egg white protein. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 38, p. 42-48, 2015.

LIASET, B.; NORTVEDT, R.; LIED, E.; ESPE, M.; Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) frames by Protamex protease. **Process Biochemistry**, v.37, p.1269, 2002.

LICEAGA-GESUALDO, A.M.; LI-CHAN, E.C.Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*clupea harengus*). **Jornaul Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1000-1004, 1999.

MACKIE, I. M. Fish protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v.17, p.26-28, 1982.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Relatório de Gestão SFA/SP Exercício de 2013. São Paulo, mar. 2014. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/SFA\\_SP](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/SFA_SP)>. Acesso em: 24 jul. 2017.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por via química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

MICHAELIS L., MENTEN M.; **Biochem. Z.**, v. 49, p. 333, 1913.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 6th. Ed. New York: Wiley, 2005.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Biotecnologia – enzimas ferramentas na indústria. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 242, 2007.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 57-67, 2003.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 101-108, 2004.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, p. 313, 2005.

OLIVEIRA, M.S.R.; FRAZEN, F. DE L.; TERRA, N.N. Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas proteolíticas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 291-305, 2014.

OLIVEIRA, M.S.R.; FRAZEN, F. DE L.; TERRA, N.N.; KUBOTA, E.H. Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados proteicos a partir de carcaças de frango desossadas manualmente. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 18, n. 3, p.199-210, 2015.

O'CONNELL, J. E. SARACINO, P.; HUPPERTZ, T.; UNIAKE, T.; DE KRUIF, C.G.; KELLY AL.; FOX, P.F. Influence of ethanol on the rennet-induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 312-317, 2006.

PATEL P. S., Multi-Objective Job Scheduler using Genetic Algorithm in Grid Computing. **International Journal of Computer Applications**, v. 14, p. 34, 2014.

PÉREZ-GÁLVEZ, R.; ALMÉCIJA, C.F.; ESPEJO, E.J.; GUADIX, M. Bi-objective optimisation of the enzymatic hydrolysis of porcine blood protein. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 305-310, 2011.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2161-2172, 2005.

QI, B. CHEN, X.; SHEN, F.; SU, Y.; WAN, Y. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw Pretreated by Alkaline Peroxide Using Response Surface Methodology. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 7346-53, 2009.

RAFTANI, A. Z.; SAFARI, R.; BAKHSHANDEH, T.; VAVSARI, F.A. Functional properties of fish protein hydrolysates from Cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle produced by two commercial enzymes. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, Sari, v. 4, n. 15, p. 1485-1499, 2016.

REED, G. **Enzymes in food processing**. 2 ed. London: Academic Press, p. 573, 1975.

RIBEIRO, R.R. Produção de biogás a partir de hidrolisados gerados no pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental**. Universidade Federal de Ouro Preto. 86 p. 2016.

ROBBINS, K.R. A method, SAS program, and example for fitting the broken-line to growth data. **University of Tennessee Agricultural Experimental Station Research Report**, v. 86, p. 1-8, 1986.

ROSLAN, J.; MUSTAPA M. S.; YUNOS, K.F.; ABDULLAH, N. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Tilapia Muscle (*Oreochromis niloticus*) using Response Surface Methodology (RSM). **Sains Malaysiana**, v. 43, p.1715-1723, 2014.

SAFARI, R.; NASROLLAZADEH. H.; POURGHOLAM, R.; MOTALEBI, A.A.;

GHOROGHI, A. Use of Hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) head as peptone for *Vibrio anguillarum* and optimization using response surface method (RSM). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 20, p. 1-11, 2011.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico**, Ed Eventos, Rio de Janeiro, p.221, 2002.

SALZANO JUNIOR, I. **Métodos de análise de nitrogênio/proteína em suplementos nutricionais à base de whey (proteína do soro de leite) e variação nos resultados**. Sorocaba: Vitafor Nutriente, p. 35, 2013.

SANTOS, S.A.; MARTINS, V.G.; SALLAS-MELADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 72-77. 2009.

SAS INSTITUTE INC System for Microsoft windows, Release 9.4, Cary, NC, USA. **(CD-ROM)**. 2012.

SEO H. W., JUNG, E.Y.; GO, G.W.; KIM, G.D.; JOO, S.T.; YANG, H.S. Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, p. 106–111, 2015.

SILVA, S.; MACALTA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides, **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1-15, 2005.

SHAHIDI, F. Seafood processing byproducts. **Seafoods: chemistry, processing technology and quality**, Blackie, London, p. 321-324, 1994.

SHI, X.; BOSENKO, D.V.; ZINKEVICH, N.S.; FOLEY, S.; HYDE, D.R.; SEMINA, E.V.; VIHTELIC, T.S. Zebrafish pitx is necessary for normal lens and retinal development. **Journal Mechanisms of Development**, v. 122, p. 513-527, 2005.

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T.; Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1415-1424, 2005.

SPELLMAN, D.; McEVOY, E.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Protease and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of tnbs, opa and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 6, p. 447-453, 2003.

VALENCIA, P. M.; PINTO, Y. S. Almonacid, identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 258-264, 2014.

VAZ, R.S.; PRADO, M. R. M.; CARVALHO, F. Biotecnologia na Indústria farmacêutica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. n. 73, p. 36-39, 2008.

VERHAEGHE, T.; VLAEMYNCK, G.; DE BLOCK, J.; VAN WEYENBERG, S.; HENDRICKX, M. Thermal inactivation kinetics of proteases and polyphenoloxidase in brown shrimp (*Crangon crangon*), **Food Chemistry**, v. 197, p. 641-647, 2016.

VIANA, F. R. Effect of different parameters on the quality of meat emulsions. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 5-10, 2004.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 782, 2006.

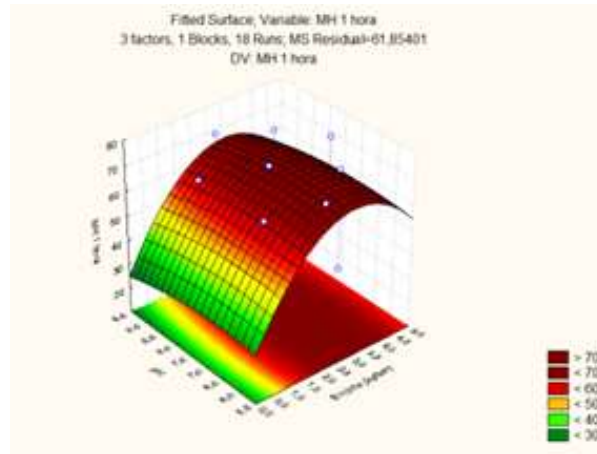
WILBERT, C.A.; KRABBE, E. L.; NICOLOSO, R. S.; RIBEIRO, J. B.; MORES, N.; CARON, L.; LIMA, G. J. M. M. **Relatório Anual de Atividades do Projeto Tecnologias para Destinação de Animais Mortos**. 179. ed. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2016. 41 p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1062447/relatorio-anual-de-atividades-do-projeto-tecnologias-para-destinacao-de-animais-mortos-tec-dam>>. Acesso em: 08 jan. 2018.

ZAVAREZE, E, R. et al. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, Brasília, v. 32, n. 7, p.1739-1743, 10 ago. 2009.

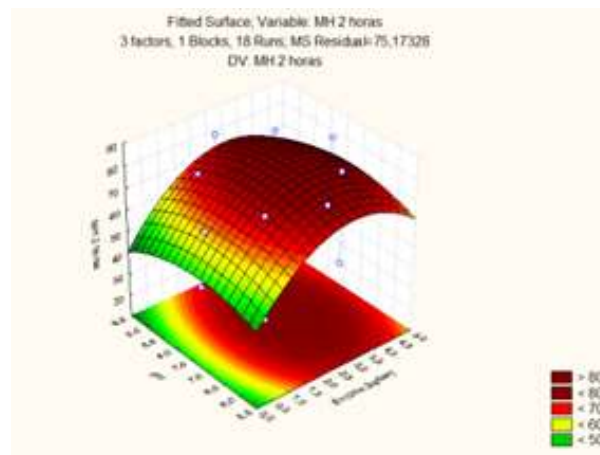


**APÊNDICE 1: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA A OBTENÇÃO DE  
MATÉRIA HIDROLISADA UTILIZANDO A ENZIMA ALCALASE:  
INTERAÇÃO ENTRE (pH) X (T), EM DIFERENTES HORAS DE  
COLETA. A) 1H; B) 2H; C) 6H; D) 12H; 24H; E) 48H.**

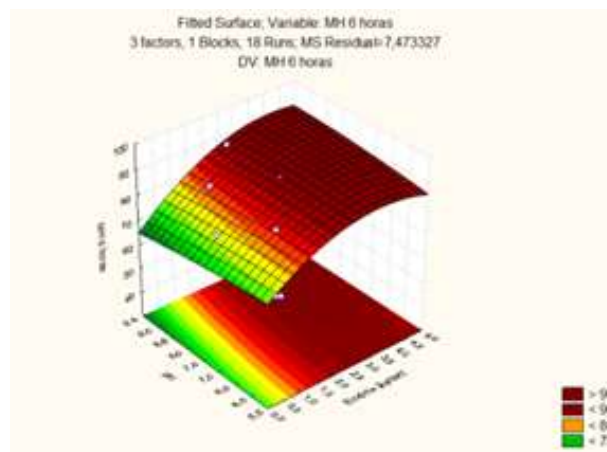
**A)**



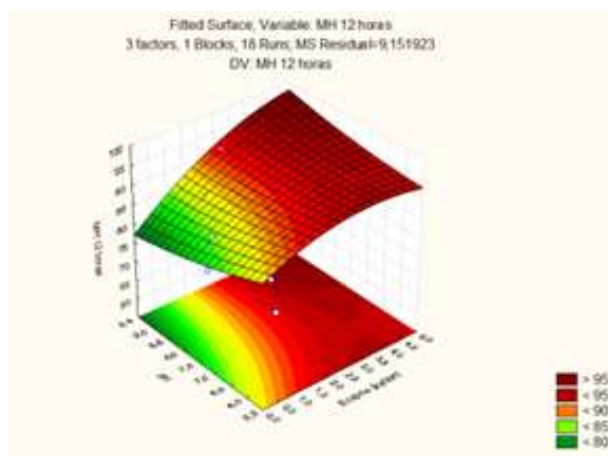
**B)**



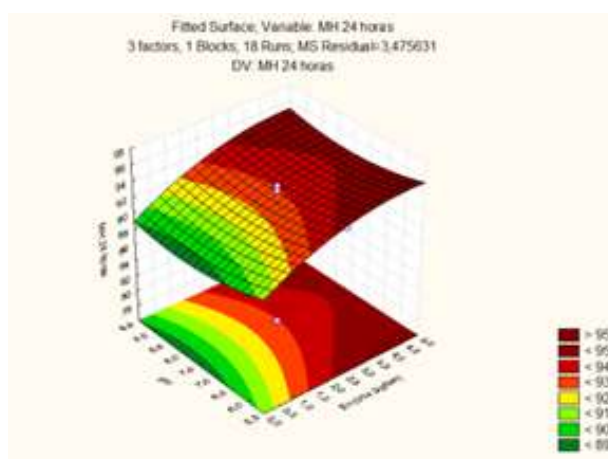
**C)**



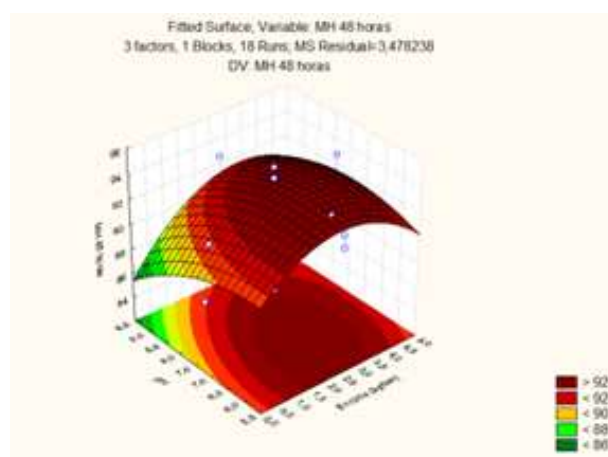
D)



E)

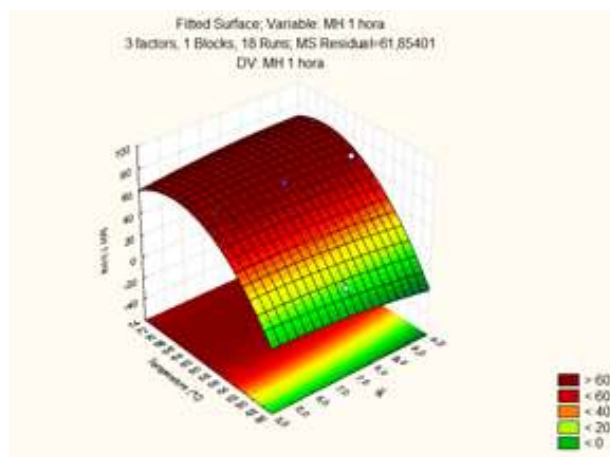


F)

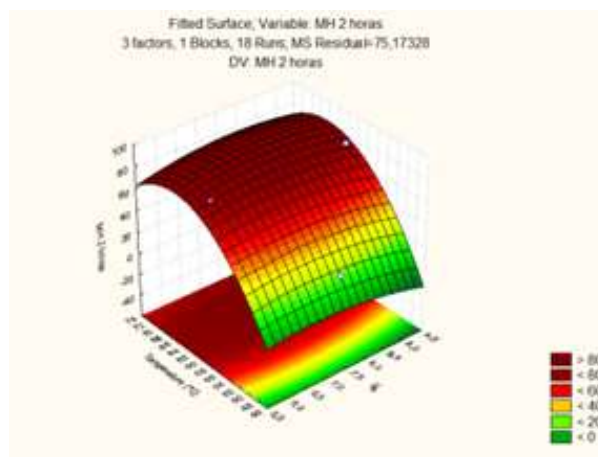


**APÊNDICE 2: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA A OBTENÇÃO DE  
MATÉRIA HIDROLISADA UTILIZANDO A ENZIMA ALCALASE:  
INTERAÇÃO ENTRE (pH) X (E), EM DIFERENTES HORAS  
DE COLETA. A) 1H; B) 2H; C) 6H; D) 12H; 24H; E) 48H.**

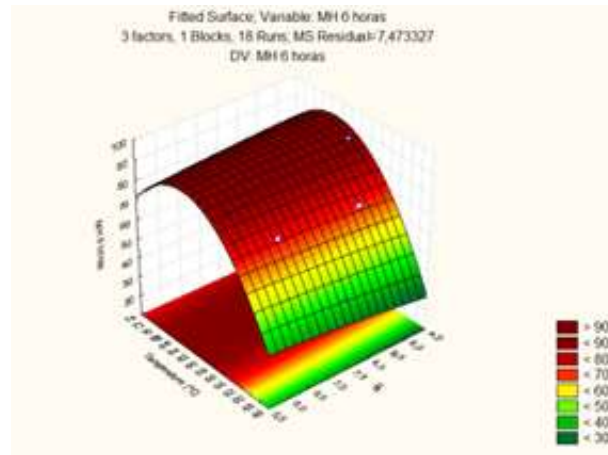
**A)**



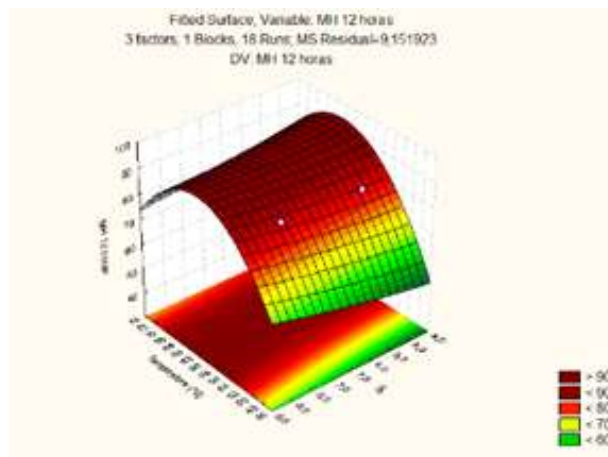
**B)**



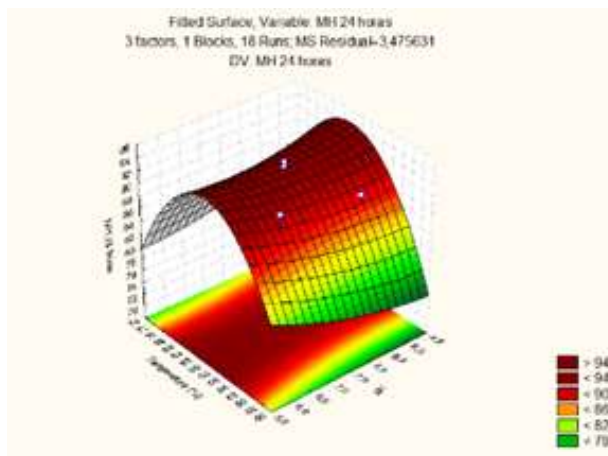
C)



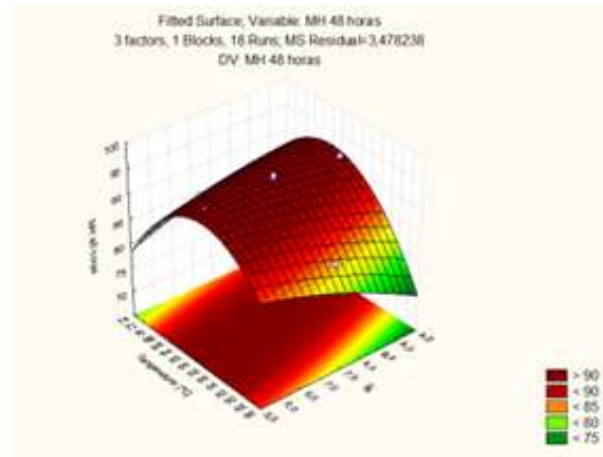
D)



E)



F)



## ANEXO 1: FICHA TÉCNICA DA ALCALASE

Alimentos / 2002-20044-01.pdf

## Ficha técnica

Página 1:4



# Alcalase® de Grau Alimentício

## Descrição

Alcalase é uma enzima proteolítica produzida por fermentação submersa de uma cepa selecionada do *Bacillus licheniformis*. O principal componente enzimático, a Subtilisina A (do Inglês, Subtilisin Carlsberg), é uma endoproteínase extensivamente descrita em literatura.

A Tabela 1 resume algumas das propriedades bioquímicas da proteinase em Alcalase.

As condições ótimas para a Alcalase são temperaturas entre 55°C e 70°C, dependendo do tipo de substrato, e pH entre 6,5 e 8,5.

	Alcalase
Nome genérico	"Subtilisin Carlsberg"
Tipo de ação	Endopeptidase
Natureza do local catalítico	Serina
Inibido por:	
DPP & PMSF <sup>1)</sup>	+
EDTA <sup>2)</sup> & fosfato	0
Inibidor tripsina de soja	0
Ligações atacadas na cadeia B oxidada da Insulina <sup>3)</sup>	4-5, 9-10, 11-12, 15-16, 26-27
Peso molecular (aprox.)	27.300
<sup>1)</sup> DPP = Diisopropil fluorofosfato, PMSF = Fenilmetilaurilfluoreto	
<sup>2)</sup> EDTA = Ácido Etilenediamina tetra-acético	
NH <sub>2</sub> -Phe-Val-Arg-Gln-His-Leu-Cys(SH)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-	
1 5 10 15	
Tyr-Leu-Val-Cys(SH)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala	
17 20 25 30	
(de Johansen, J.T. et al., C.R. Trav. Lab. Carlsberg 36, 365-384, 1968)	

Propriedades bioquímicas da Alcalase.

## Propriedades do produto

### Tipo de produto

Alcalase 2.4 L é um líquido marrom escuro e prontamente solúvel em água em todas as concentrações. A cor pode variar de lote para lote e intensidade da cor não é indicação da força de atividade do produto.

### Atividade

Alcalase de grau alimentício é padronizada em Unidades Anson por g (AU/g).

Alcalase 2.4 L ..... Atividade declarada: 2.4 AU/g

A atividade proteolítica é determinada de acordo com o padrão analítico usando o método DMC.

Veja nos Métodos Analíticos para maiores informações.

### Status de grau alimentício

O produto está de acordo com as especificações de pureza recomendadas para as enzimas de grau alimentício definidas pelo FAO/WHO – Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

### Embalagem

Veja na Lista de Embalagens para maiores informações.

### Aplicação

Alcalase de grau alimentício é uma protease bacteriana altamente eficiente, desenvolvida para a hidrólise de todos os tipos de proteínas. Recomendações mais detalhadas sobre as várias aplicações do produto; são apresentadas em folhetos à parte, disponíveis mediante solicitação.

## Parâmetros de reação

### Atividade

Analisando a enzima Alcalase em diversos valores de pH, usando o método Anson/hemoglobina modificado, se encontra a atividade ótima em pH entre 6.5 e 8.5 (Figura 1). Semelhantemente, sob condições analíticas, a Alcalase tem a sua temperatura ótima em torno de de 60°C (Figura 2).



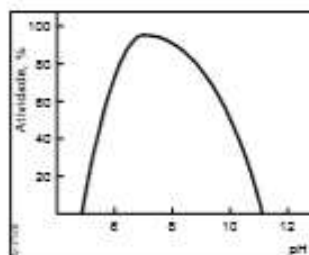


Fig. 1. Influência do pH na atividade da Alcalase.

Concentração da Enzima: 0,06 AU/litro  
 Temperatura: 60°C (140°F)  
 Método: Análise Anson/  
 hemoglobina modificada  
 Tempo de Reação: 10 minutos

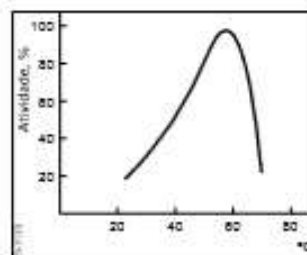


Fig. 2. Influência da temperatura na atividade da Alcalase.

Concentração da Enzima: 0,06 AU/litro  
 pH: 8,0  
 Método: Análise Anson/  
 hemoglobina  
 modificada  
 Tempo de Reação: 10 minutos

A Figura 3 ilustra a produtividade da Alcalase em várias temperaturas em substratos de proteína do soro do leite e proteína de soja, respectivamente. A produtividade é apresentada em valores relativos e medida como % de grau de Hidrólise (DH, do Inglês – degree hydrolysis) obtido em 4 horas. DH é definido como o percentual de ligações peptídicas clivadas.

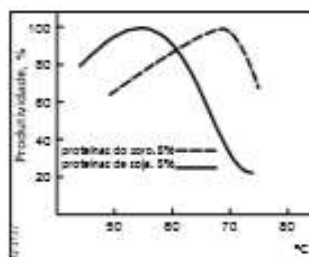


Fig. 3. A produtividade da Alcalase 2.4 L medida em várias temperaturas em proteína de soja e do soro do leite.

Proteína %: 5,0  
 Dose Enzima (na proteína): 0,51 %  
 pH: 8,0  
 Reação: 4 horas

### Inativação

A Alcalase pode ser inativada em 30 minutos na temperatura de 50°C ou em temperatura mais alta quando o pH for de 4, e em 10 minutos na temperatura de 85°C ou mais alta, quando o pH for igual a 8.

No entanto, a Inativação é muito dependente do substrato (concentração do substrato, pH, etc.). Assim, a documentação para a eliminação eficiente da Alcalase deve ser baseada na análise real para a detecção de atividade residual. Para maiores informações, veja no Método para a detecção da atividade de protease residual em hidrolisado de proteína.



## Segurança

Enzimas são proteínas e a inalação de pó ou aerossóis podem provocar sensibilização e causar reações alérgicas em pessoas sensibilizadas. Algumas enzimas podem irritar a pele, olhos e membranas mucosas após contato prolongado.

Este produto pode gerar aerossóis facilmente inaláveis se for derramado ou agitado vigorosamente. Se derramado este produto pode secar e gerar pó. Material derramado deve ser enxaguado com água (evite usar água sob pressão) evitando a formação de aerossóis.

Use roupas de proteção adequadas, luvas e proteção ocular e facial, tal como está orientado na etiqueta de aviso. Lave as roupas contaminadas.

Todos os produtos vêm acompanhados de uma Ficha de Segurança.

Mais informações sobre como manipular este produto com segurança podem ser obtidas mediante solicitação.

## Armazenamento

Condições de armazenamento recomendadas: 10°C/0-25°C em embalagens intactas e protegidas do sol. Este produto foi formulado para ter uma estabilidade ótima. No entanto, com o tempo, as enzimas perdem gradativamente a atividade.

Armazenamento prolongado ou condições inadequadas, como temperatura elevada, podem exigir dosagens enzimáticas mais altas.



**Novozymes Latin America Limited**  
Rua professor Francisco Ribeiro 683  
CEP 83707-000 - Araucária - Paraná  
Brasil

Tel. +55 41 641 1000  
Fax +55 41 643 1443

**Novozymes AS**  
Krogshøjvej 38  
2880 Bagsvaerd  
Denmark

Tel. +45 8824 9999  
Fax +45 8824 9998  
info@novozymes.com  
www.novozymes.com

Além do regulamento e do direito de terceiros podem constituir um impedimento para que os clientes importem, produzam, apliquem ou utilizem certos produtos de uma forma determinada. É da responsabilidade dos clientes que o seu uso específico de produtos da Novozymes não infrinja leis e regulamentos pertinentes e, além disso, não infrinja patentes ou outros direitos de terceiros. O conteúdo deste documento está sujeito a alterações sem aviso prévio.

2003-2044-01 07.12.2002 © Novozymes AS

